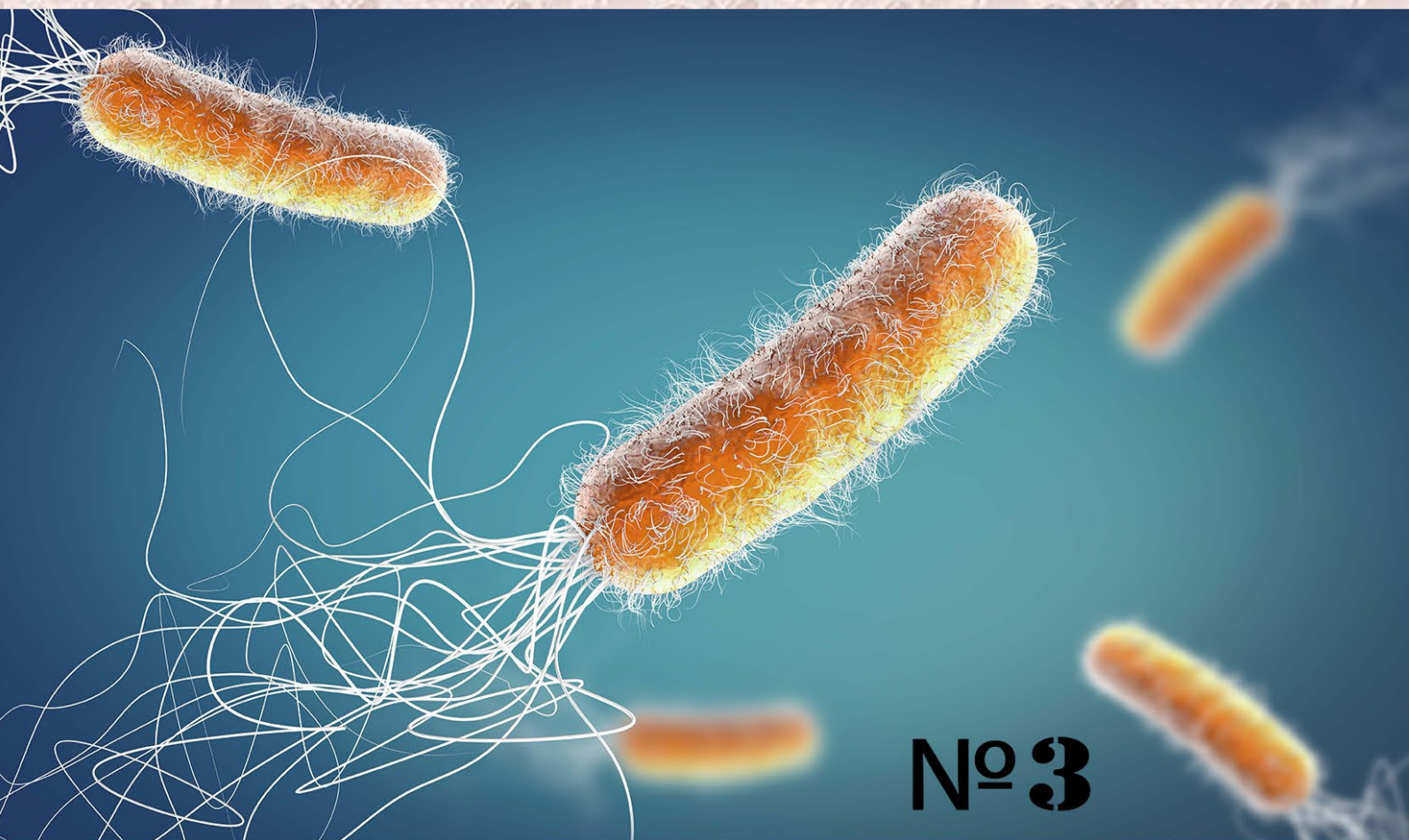


16+

ISSN 2304-4691

Актуальная биотехнология



№3

2024

ISSN 2304-4691

**Основан в 2012г.
г. Воронеж**

Актуальная биотехнология

№ 3

2024



Учредитель: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Главный редактор

д.б.н., профессор О.С. Корнеева

Редакционный совет

д.б.н., профессор Е.Н. Ефименко

д.б.н., профессор В.В. Ревин

д.б.н., профессор Д.А. Черенков

д.б.н., профессор С.С. Антипов

д.т.н., профессор В.И. Панфилов

д.т.н., профессор Е. В. Богданова

д.т.н., профессор А.А. Дерканосова

д.т.н., профессор Ю.А. Максименко

к.т.н., доцент А.С. Муравьев

к.т.н., доцент Е.П. Анохина

Журнал «Актуальная биотехнология» выходит 4 раза в год

Официальный сайт «Актуальная биотехнология» www.actbio-vsuet.ru

Подписной индекс издания в агентстве «Роспечать» 58012

Ответственный секретарь: ДЕРКАНОСОВА А.А. (эл. почта: post@actbio-vsuet.ru)

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций:

Свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-83978 от 21 сентября 2022 г.

Адрес редакции, издательства и отдела полиграфии ФГБОУ ВО «ВГУИТ»

394036, Воронеж, пр. Революции д.19 ауд.11

тел./факс: (473) 255-37-16

E-mail: post@actbio-vsuet.ru

Сдано в набор 06.11.2024. Подписано в печать 13.11.2024

Выход в свет: 25.11.2024

Усл. печ. л. 10,65 Тираж 500 экз. Заказ.

Цена – свободная.

© ФГБОУ ВО

«Воронеж. гос. ун-т инж.
технол.», 2024

Содержание

МАТЕРИАЛЫ XII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ «БИОТЕХНОЛОГИЯ: НАУКА И ПРАКТИКА»

ДВУХДОМЕННЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛАККАЗЫ: МОДИФИКАЦИЯ И ИММОБИЛИЗАЦИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ С.В. Алферов, А.В. Абдуллатыпов, Л.И. Трубицина, К.А. Егоров, О.Н. Понаморева	5
ПРИМЕНЕНИЕ БИНАРНОГО ВЕКТОРА PBL121 В ТРАНСФОРМАЦИИ AGROBACTERIA АНТИСМЫСЛОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ АНТИ-МИР775А Д.Н. Федорин, А.Е. Хомутова, А.Т. Епринцев	9
ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРДЕСТРУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ А.С. Шелковникова, Е.В. Сордонова, Г.П. Ламажапова	11
СТРУКТУРА АЭРОБНОГО ГАЛОФИЛЬНОГО МЕТИЛОТРОФНОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ГИПЕРГАЛИННОГО ОЗЕРА ДУНИНО ИЗ ГРУППЫ СОЛЬ-ИЛЕЦКИХ ОЗЕР (ОРЕНБУРГСКАЯ ОБЛАСТЬ) М.Н. Шустова, Е.Н. Капарулина, Н.В. Доронина	14
БИОСИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ЕЁ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ П.А. Горбатова	15
ПОЛУЧЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ MISCANTHUS X GIGANTEUS СОРТА КАМИС РОССИЙСКОЙ СЕЛЕКЦИИ А.А. Зенкова	18
БИОТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ЦИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ТИРЕОГЛОБУЛИНА, ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЫ И РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА А.В. Зубков, Л.Г. Бутова, А.А. Корноухова, М.В. Потоцкая, Н.С. Кузьмина, О.А. Свитич	22
ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ГРИБНЫХ ПРОТЕАЗ ПРИ ОБРАБОТКЕ ОЛЕНЬИХ ШКУР Е.И. Курбатова, А.С. Середа, Е.В. Костылева, К.В. Вьюгин, Е.А. Михайловский	26
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ МУТАНАЗЫ, РАСЩЕПЛЯЮЩЕЙ А- 1,3-D-ГЛЮКАН И РАЗРУШАЮЩЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ, ИЗ TRICHODERMA HARZIANUM, ЭКСПРЕССИРОВАННОЙ В PENICILLIUM VERRUCULOSUM О.А. Синицына, П.В. Волков, И.Н. Зоров, А.М. Рожкова, Б.С. Комарова, Н.С. Новикова, Н.Е. Нифантьев, А.П. Синицын	27
ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЛЕПЕСТКАХ БАРХАТЦЕВ РАЗЛИЧНОГО ВИДА И ЦВЕТОВОГО ОКРАСА С.И. Лоскутов, Я.В. Пухальский, Н.И. Воробьев	28
СПОСОБНОСТЬ GORDONIA AMICALIS G2 ПРОДУЦИРОВАТЬ БИОСУРФАКТАНТЫ ГЛИКОЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ И.А. Нечаева, А.С. Филиппова, А.Н. Осина	30
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА НЕКОТОРЫХ ПИЩЕВЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ С.М. Петров ^а , С.Л. Филатов ^б , М.С. Михайличенко ^б , Н.М. Подгорнова ^б	31
РАЗРАБОТКА ИНОКУЛЯНТА ДЛЯ СОИ, СОДЕРЖАЩЕГО БАКТЕРИИ РОДА BRADYRHIZOBIUM Е.А. Бунеева, А.С. Рябова, Д.А. Черенков, А.А. Толкачёва, С.А. Ковалевский	35
ПОЛУЧЕНИЕ МЕЛАНИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАЗЛИЧНОГО ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ Прутенская Е.А., Ушаповский В.И., Волков А.О.	36
ПУЛЛОТРИТИЦИН КАК КАТАЛИЗАТОР ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА С.С. Перкин, О.С. Корнеева, Г.П. Шуваева, Е.А. Мотина	37
ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ И ОПЕРАЦИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ И ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КАТАЛАЗ МЕТИЛОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ METHYLOPHILUS QUAYLEI А.Б. Пшеничникова, М.А. Климович	38
МАТЕРИАЛЬНЫЙ БАЛАНС ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ИЗ БИОМАССЫ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО Е.А. Скиба	39
АНАЛИЗ МЕТОДОВ ХРАНЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ О.С. Веселова, А. Андреева, С.Г. Давыденко	42
ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА БАВ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ RHODOTORULA LACTOSA ВКПМ-У-3868 И ОЦЕНКА ЕГО ВЛИЯНИЯ НА МИКРОФЛОРУ МОДЕЛЬНОЙ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ В УСЛОВИЯХ IN VITRO К.С. Должикова, М. Делич, К.И. Киенская, И.А. Буторова	43
ОСОБЕННОСТИ МОДЕРНИЗАЦИИ СИСТЕМЫ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ: РЕЗУЛЬТАТЫ РЕАЛИЗАЦИИ ПИЛОТНЫХ ПРОЕКТОВ М.Г. Сульман, Г.Н. Демиденко	45
К ВОПРОСУ О ВЛИЯНИИ УЛЬТРАЗВУКА НА ПРОЦЕСС КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ CHLORELLA VULGARIS М.С. Темнов, В.О. Миленина, А.К. Брянкина, К.И. Меронюк, Д.С. Дворецкий	46
ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧНОСТИ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ИЗ БИОМАССЫ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО Н.А. Шавыркина	50
ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ БИОСЕНСОРА С ФЕРМЕНТПОЛИМЕРНЫМ ПОКРЫТИЕМ Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, М.Г. Сульман, А.И. Сидоров, В.Г. Матвеева	53
ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАКЦИИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ В БАКТЕРИЯХ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ РНК ДЛЯ БОРЬБЫ С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ ПАТОГЕНАМИ ПОЛЕЗНЫХ НАСЕКОМЫХ И ВРЕДИТЕЛЯМИ Р.Р. Фадеев, В.В. Долгих	54
ШТАММ БЦЖ С НОКАУТИРОВАННЫМ ГЕНОМ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ М.С. Шумков, А.В. Гончаренко	55
ПРОБЛЕМЫ С РЕАЛИЗАЦИЕЙ ФГОС-4 Р.Р. Биглов	56
ПРЕИМУЩЕСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СТЕМ-ОБРАЗОВАНИЯ В ПОДГОТОВКЕ ИНЖЕНЕРОВ Н.И. Репников, С.И. Нифталиев, Л.В. Лыгина	58

ДВУХДОМЕННЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛАККАЗЫ: МОДИФИКАЦИЯ И ИММОБИЛИЗАЦИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

С.В. Алферов¹, А.В. Абдуллатыпов^{1,2}, Л.И. Трубицина³, К.А. Егоров¹, О.Н. Пономарева¹

¹ Тульский государственный университет, Тула, Россия

² Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное структурное подразделение
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцино, Россия

³ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН – обособленное структурное подразделение
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцино, Россия

Введение. Лакказы (КФ 1.10.3.2, пара-дифенол: кислородоксидоредуктаза) – это фенолоксиляющие ферменты, катализирующие ряд реакций окисления ароматических и неароматических соединений. Эти медьсодержащие белки относятся к семейству “голубых” мультимедных оксидаз, содержащих в активном центре четыре атома меди, координированных имидазольными группами остатков гистидина. Группа ферментов включает множество белков с различной субстратной специфичностью и разнообразными биологическими функциями. На основе количества медных доменов лакказы классифицируются как ферменты с двумя (2d), тремя (3d) и шестью доменами (6d). Чаще всего лакказа, найденная у грибов, растений, насекомых, содержит три домена [1, 2]. Конечным акцептором электронов в каталитических реакциях лакказ является кислород, который восстанавливается до воды [3]. Иммобилизация лакказы (адсорбция на носителях, внедрение в сетку, внедрение в микрокапсулы, ковалентное связывание) является основным подходом для преодоления таких ограничений как низкая стабильность фермента, короткий срок службы, трудность повторного использования. Сам же процесс иммобилизации позволяет улучшить устойчивость фермента с точки зрения температуры, pH, хранения и эксплуатации. Особенностью ферментов лакказ является способность восстанавливать кислород, получая электроны непосредственно от электрода, что, в совокупности с применением углеродных наноматериалов для иммобилизации фермента, позволяет разрабатывать катоды для биотопливных элементов [4].

Закрепление лакказы на поверхности электрода позволяет реализовать стратегию прямого переноса электронов (ППЭ) от электрода на фермент. Реакция ППЭ проходит через следующие стадии: восстановление T1 центра (электрод отдает электрон), внутримолекулярный перенос электрона с T1 на T2/T3 кластер, восстановление молекулы кислорода до воды в T2/T3 кластере. Наличие углеродных наноструктур на поверхности графитовых электродов не только увеличивает площадь поверхности, но и обеспечивает подходящую матрицу для иммобилизации молекул, что позволяет использовать их в биотопливных элементах в качестве катодного биокатализатора восстановления кислорода [5]. Таким образом многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) играют важную роль при сопряжении ферментов с электродами.

Двухдоменные бактериальные лакказы обычно обладают низким окислительно-восстановительным потенциалом медного центра (от 0,35 до 0,4 В) [6, 7], что ограничивает их способность окислять субстраты и делает их менее полезными в промышленности. Однако двухдоменные лакказы, в отличие от грибковых трех доменных лакказ [8], являются ферментами с высокой термостабильностью и способны катализировать окисление фенольных соединений при щелочных и нейтральных значениях pH. С этой точки зрения, единственным недостатком лакказ, ограничивающим их применение в биотехнологических процессах, является их низкий окислительно-восстановительный потенциал [9].

Современным подходом к получению лакказ с требуемыми свойствами или улучшенными биокаталитическими характеристиками (окислительно-восстановительный потенциал, специфичность, каталитическую эффективность, стабильность и т. д.) является сайт-направленный мутагенез [10]. Было обнаружено, что природа аксиального лиганда влияет на электронную структуру и перенос электронов в медный участок T1. В высокопотенциальных и среднепотенциальных грибковых лакказах фенилаланин и лейцин/изолейцин действуют как аксиальные лиганды медного участка T1 соответственно, в то время как низкопотенциальные растительные и бактериальные лакказы содержат метионин в качестве аксиального лиганда [11].

Недавно в нашей научной группе активно исследовались две новые двухдоменные актинобактериальные лакказы: ScaSL из *Streptomyces carpinensis* [12] и CjSL из *Catenuloplanes japonicus* [3]. В отличие от других двухдоменных лакказ, эти два фермента обладали средним

окислительно-восстановительным потенциалом (0,47 В и 0,51 В соответственно) и имели аминокислоту метионин в качестве аксиального лиганда Т1-участка меди. Вероятно, существуют другие детерминанты, которые могут способствовать повышению потенциала этих ферментов. В данной работе предпринята попытка оценить влияние одного из остатков аминокислот (Н286) не из ближнего окружения ионов меди на потенциал Т1 медного центра лакказы ScaSL из *Streptomyces carpinensis*.

Результаты и обсуждение. Для лакказы ScaSL из *Streptomyces carpinensis* получены три мутантных белка Н286А, Н286Т с заменой гистидина в положении 286 на аланин и треонин, соответственно. Множественное выравнивание выявило что у низкопотенциальных лакказ в позиции 286 расположена гидрофобная аминокислота аланин. У лакказы CjSL, чей потенциал превышает потенциал лакказы ScaSL, расположена полярная незаряженная аминокислота треонин. Поэтому мы предполагали, что у мутанта Н286А величина потенциала будет снижена, у мутанта Н286Т – повышена. Несмотря на то, что гистидин в позиции 286 не относится ко второй координационной сфере Т1-центра, а также не является аксиальным лигандом атома меди Т1-центра, он расположен на поверхности белка рядом со входом в субстратный туннель, ведущий к Т2/Т3-медному центру. Было высказано предположение, что остаток аминокислоты в положении 286 будет влиять на эффективность связывания и восстановления кислорода, и, опосредованно, на величину редокс-потенциала лакказы в условиях биоэлектрокатализа.

Для организации прямого переноса электронов (ППЭ) расстояние между электродом и окислительно-восстановительным центром фермента не должно превышать 20 Å (2 нм). т. е. в данном случае электрод будет являться субстратом лакказы. ППЭ между поверхностью электрода и лакказой возможен только в том случае, если фермент правильно ориентирован относительно поверхности электрода Т1-центром (рис. 1). Этому в значительной мере способствует применение МУНТ.

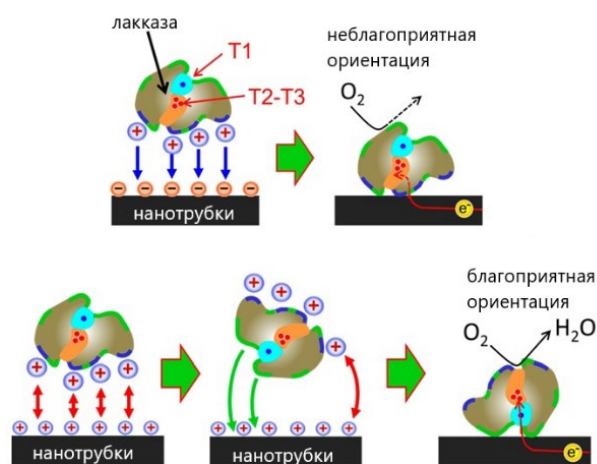


Рисунок 1. Схема прямого переноса электронов и ориентации фермента относительно поверхности электрода, модифицированного нанотрубками

Для всех мутантов и белка дикого типа удалось обеспечить ППЭ в биоэлектрокаталитических системах на основе стеклогуглеродных электродов, модифицированных окисленными МУНТок. В данном случае ключевую роль играют именно окисленные нанотрубки, т. к. они имеют преимущественно карбоксильные группы на всей поверхности, благодаря которым поверхность отрицательно заряжена. Чтобы объяснить ориентацию лакказ на поверхности наноструктурирующего материала с помощью программы YASARA Structure было рассчитано распределение электростатического потенциала лакказы при pH 5,0 в водном растворе с 1,17 % NaCl. Отображение рассчитанного электростатического потенциала приведено на рисунке 2.

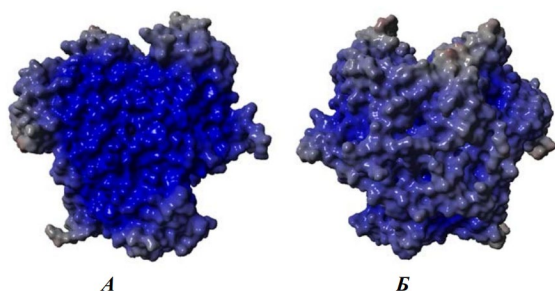


Рисунок 2. Распределение электростатического потенциала для лакказы при pH 5. А – вид со стороны Т1 активного центра, Б – вид с противоположной от Т1 активной стороны. Синие участки обозначают положительный потенциал, серые – отрицательный

Как можно видеть лакказы имеет положительный заряд со стороны T1 центра, который служит акцептором электронов, здесь наблюдается более положительный заряд, чем с противоположной. Исходя из этого благоприятная для прямого переноса электронов ориентация будет достигаться при модификации электрода отрицательно заряженными углеродными нанотрубками.

Для организации биоэлектрокаталитического восстановления кислорода при участии лакказ использовали стеклоуглеродные электроды, поверхность которых модифицировали МУНТок, как описано в работе [13]. Ферменты наносили на торцевую поверхность электродов. На рисунке 3 представлены вольтамперные зависимости стеклоуглеродных электродов, модифицированных МУНТок и затем мутантной лакказой H286T. Аналогичные зависимости получены для остальных белков.

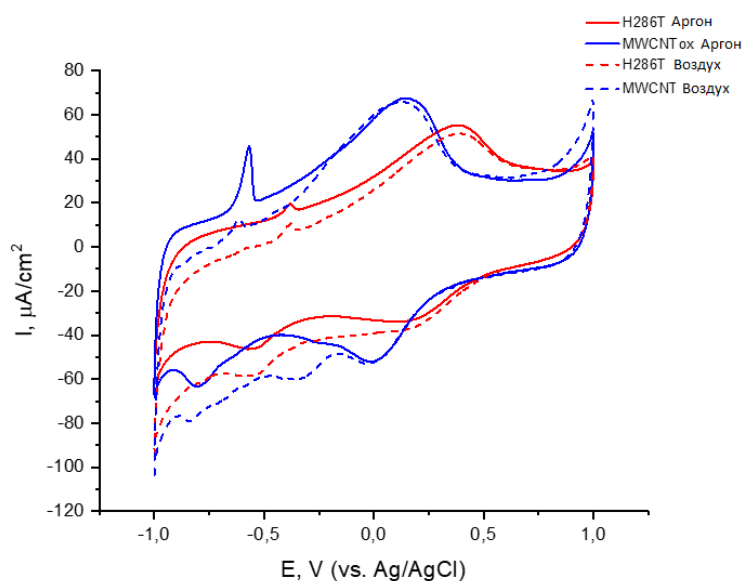


Рисунок 3. Вольтамперограммы стеклоуглеродных электродов, модифицированных МУНТок и затем мутантной лакказой H286T

ППЭ термодинамически возможен, когда редокс-потенциал лакказы больше потенциала, поданного на электрод [14]. Потенциал, при котором ток восстановления кислорода не наблюдается, можно считать редокс-потенциалом лакказы в этих условиях. Для оценки значения редокс-потенциала лакказ применили метод хроноамперометрии, который недавно позволил охарактеризовать двухдоменную лакказу CjSL как среднепотенциальную оксидазу [13]. На рисунке 4 представлены хроноамперометрические зависимости мутантного белка H286T, закрепленного на электроде, модифицированном МУНТок при различных потенциалах.

На полученных хроноамперограммах после подачи кислорода (включение мешалки) значение тока увеличивается при потенциалах +0,1, +0,2 В против Ag/AgCl. Однако дальнейшее увеличение приложенного потенциала приводит к уменьшению тока восстановления кислорода до полного его отсутствия. На основе проведенных хроноамперометрических исследований нами были определены редокс-потенциалы ScaSL и мутантов по H286 в биоэлектрохимической системе с МУНТок, которые составили соответственно: 0,47 В для дикого белка, 0,45 для H286A и 0,50 для H286T.

Таким образом, как и предполагалось, у мутанта H286A величина потенциала снизилась, но повысилась его стабильность при pH 9 и 11, у мутанта H286T потенциал увеличился, однако снизилась термостабильность. Однако все лакказы (дикий тип и мутанты) практически не различались по эффективности биоэлектрокатализа, т. е. замена H286 на аланин и треонин практически не повлияли на эффективность биоэлектрокаталитического восстановления кислорода на электродах, модифицированных МУНТок.

При потенциалах выше 0 В (относительно Ag/AgCl) в электрохимической системе на основе модифицированного МУНТок стеклоуглеродного электрода не регистрируются токи восстановления кислорода (поляризационные волны восстановления в среде аргона и при продувке воздухом не отличаются) (Рис. 3, синие сплошная и пунктирная кривые). В присутствии лакказы уже при потенциалах 0,5 В можно заметить увеличение тока восстановления в среде с кислородом (Рис. 3, красная пунктирная кривая), что обусловлено вкладом процесса восстановления молекулярного кислорода при участии лакказы (прямой перенос электронов). Для других исследуемых ферментов получили похожие результаты: наблюдали появление тока восстановления кислорода в интервале 0,3–0,5 В.

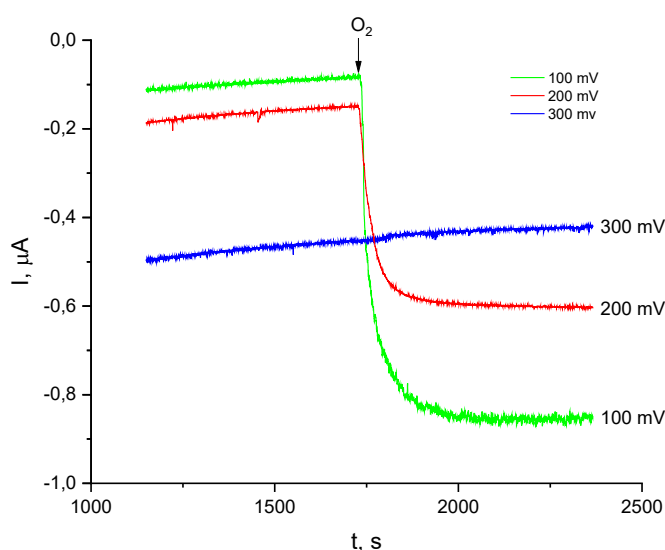


Рисунок 4. хроноамперометрические зависимости мутантного белка H286T на модифицированном МУНТок электроде при потенциалах +0.1, +0.2, +0.3 В против Ag/AgC

участием подобных белков или других аминокислотных детерминант, чтобы прояснить возникшее противоречие.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-20013, <https://rscf.ru/project/24-14-20013> и при поддержке Комитета Тульской области по науке и инноватике.

Литература

1. Komori H., Higuchi Y. Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins. // *Biomol Concepts*. 2010, 1; 1(1) : 31–40. doi: 10.1515/bmc.2010.004. PMID: 25961983.
2. Ihssen J. et al. Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli* // *Scientific reports*. – 2015. – Т. 5. – №. 1. – С. 1–13.
3. Trubitsina L.I. et al. Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes // *PeerJ*. – 2021. – Т. 9. – С. 11646.
4. Bollella P., Katz E. Enzyme-based biosensors: Tackling electron transfer issues // *Sensors*. – 2020. – Т. 20. – №. 12. – С. 3517
5. Akanda M.R. et al. Recent advances in nanomaterial-modified pencil graphite electrodes for electroanalysis // *Electroanalysis* – 2016 – V. 28 – №. 3 – P. 408–424.
6. Gunne, M., et al., Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus*. // *Febs j*, 2014. 281(18): p. 4307–18
7. Trubitsina, L.I., et al., Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*. // *Biochimie*, 2015. 112: p. 151–159
8. Upadhyay, P., et al. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. // *3 Biotech*, 2016. 6(1): p. 15
9. Dey, B. and T. Dutta, Laccases: Thriving the domain of bio-electrocatalysis. // *Bioelectrochemistry*, 2022. 146: p. 108144
10. Olbrich AC, Schild JN, Urlacher VB. Correlation between the T1 copper reduction potential and catalytic activity of a small laccase. // *J Inorg Biochem*. 2019; 201:110843. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110843. Epub 2019 Sep 9. PMID:31536948.
11. Toscano MD, De Maria L, Lobedanz S, Ostergaard LH. Optimization of a small laccase by active-site redesign. // *Chembiochem*. 2013 Jul 8; 14(10) : 1209–11. doi: 10.1002/cbic.201300256. Epub 2013 Jun 14.
12. Trubitsina LI, et al. A Novel Two-Domain Laccase with Middle Redox Potential: Physicochemical and Structural Properties. // *Biochemistry (Mosc)*. 2023; 88(10) : 1658–1667. doi: 10.1134/S000629723100188. PMID: 38105031.
13. Abdullatypov A. et al. Functionalization of MWCNTs for Bioelectrocatalysis by Bacterial Two-Domain Laccase from *Catenuloplanes japonicus*. // *Nanomaterials (Basel)*. 2023 Nov 25; 13(23) : 3019. doi: 10.3390/nano13233019.
14. A. Ben Tahar, K. Żelechowska, J.F. Biernat, E. Paluszkiwicz, P. Cinquin, D. Martin, A. Zebda. High catalytic performance of laccase wired to naphthylated multiwall carbon nanotubes. // *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 2020, V. 151, 11196
15. Alekseeva, O. et al., Electrochemistry of a high redox potential laccase obtained by computer-guided mutagenesis combined with directed evolution. *Electrochemistry Communications*, 2019. 106: p. 106511
16. Milton, R.D. and S.D. Minter, Direct enzymatic bioelectrocatalysis: differentiating between myth and reality. *Journal of The Royal Society Interface*, 2017. 14(131): p. 20170253

ПРИМЕНЕНИЕ БИНАРНОГО ВЕКТОРА PBL121 В ТРАНСФОРМАЦИИ AGROBACTERIA АНТИСМЫСЛОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ АНТИ-МИР775А**Д.Н. Федорин, А.Е. Хомутова, А.Т. Епринцев***Воронежский государственный университет Воронеж, Россия*

Одним из факторов снижения урожайности сельскохозяйственных культур является затопление, вследствие чего растения испытывают гипоксический стресс. Одним из способов борьбы с гипоксией является применение биотехнологических подходов, в частности, создание трансформантов на основе антисмысловых РНК.

В условиях низкого содержания кислорода (концентрация $O_2 < 2\%$) происходит запуск адаптивных реакций, в том числе, посредством микроРНК. Они представляют собой эндогенные малые некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов-мишеней на уровне транскрипции. МикроРНК775А является гипоксически-зависимой и принимает участие в регуляции адаптивных реакций растительной клетки в условиях низкого содержания кислорода. Установлено, что данная микроРНК регулирует экспрессию генов фруктозо-1,6-бисфосфатазы и глицерол-3-фосфат ацилтрансферазы на посттранскрипционном уровне.

Альдолаза (ФБА, КФ 4.1.2.13) катализирует обратимое превращение фруктозо-1,6-бисфосфат в глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат. Данный фермент принимает участие в гликолитическом пути, а также глюконеогенезе за счет цитозольных форм фермента [1]. Однако выявлены и хлоропластные формы. Установлено, что микроРНК775А образует интерферирующий комплекс с мРНК альдолазы в зоне ICL/PERM_KPHMT-лиазного домена, ответственного за формирование активного центра фермента, а также соответствующего окружения аминокислотными остатками, необходимыми для его правильной ориентации в белковой глобуле.

Глицерол-3-фосфат ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.15) имеет в клетке различную локализацию: митохондрии, плазмолемма, эндоплазматический ретикулум. Катализирует реакцию ацил-КоА и глицерин-3-фосфата с образованием лизофосфатидной кислоты и защищает ацил-КоА от β -окисления. Кроме того, за счет участия в формировании триацилглицеридов данный фермент обеспечивает синтез липидных капель, которые отвечают за передачу межклеточного сигнала [2]. Производство липидных сигнальных молекул жестко регулируется набором специализированных липид-модифицирующих ферментов и ацил-липидных метаболических сетей [3]. В частности, абиотические стрессы, такие как охлаждение, замораживание, нагревание, засуха и гипоксия, активируют опосредованные липидами сигнальные каскады, повышая толерантность растений к этим стрессам [4]. МикроРНК775А образует интерферирующий комплекс с соответствующей мРНК в зоне ацил-СоА-связывающего домена.

Контроль содержания микроРНК775А в клетке открывает возможности регулирования гликолиза и липидного обмена на уровне РНК-интерференции соответствующих генов-мишеней. Ранее была разработана технология создания коротких tandemных мишеней (STTM) для деактивации эндогенных микроРНК в *Arabidopsis* [5].

Нами была разработана STTM-конструкция для микроРНК775А *Zea mays* с учетом её дальнейшего использования при создании линии мутантов со сниженным содержанием данной микроРНК. Создание такой линии растений позволит оценить вклад микроРНК775А в регуляцию адаптивной реакции растений при гипоксии, а также позволит осуществить регуляцию гликолитического и липидного обмена с применением микроРНК.

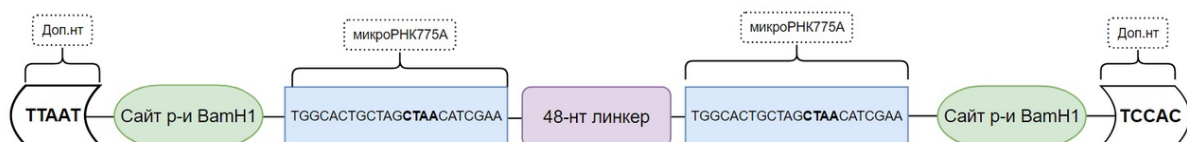


Рис. 1 Схема конструкции анти-миР для микроРНК775А. ×Доп.нт – дополнительные 5 нуклеотидов на 5'- и 3'-концах; сайт р-и BamH1 – сайт рестрикции эндонуклеазы BamH1; СТАА – область шпильки для деградации между 10-м и 11-м нуклеотидами микроРНК775А

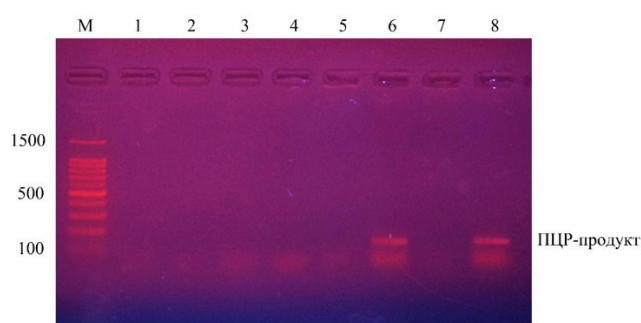


Рис. 2 Скрининг полученных колоний *E. coli* селективно-специфичной ПЦР. ПЦР-продукт обнаружен в колониях 6 и 8

Конструкция анти-миР представляет собой два нерасщепляемых сайта связывания с микроРНК775А со вставкой из трёх нуклеотидов между 10-м и 11-м нуклеотидами, соединёнными 48-нт спейсером, представляющий собой петлевой участок. С 5'- и 3'-концов присоединены сайты рестрикции *Bam*HI. Также с 5'- и 3'-концов имеются по пять дополнительных нуклеотидов, необходимых для успешного использования специально разработанных праймеров для создания двуцепочечной анти-миР в ходе полимеразной цепной реакции. Далее конструкция анти-миР775А подвергалась рестрикции эндонуклеазой *Bam*HI

(SybEnzyme, Россия) и была введена в вектор pB1121, который также предварительно рестрицирован данной эндонуклеазой *Bam*HI, согласно инструкции производителя (рис. 1).

Применение бинарного вектора pB1121 позволило получить линии трансформированных *E. coli* HB101, содержащих анти-миР775А конструкцию. Компетентные клетки штамма HB101 трансформированы вектором pB1121 с использованием метода теплового шока по стандартному протоколу. Трансформанты высевали на чашки Петри с агаризованной средой Луриа–Бертани (LB), содержащей тетрациклин. Скрининг полученных колоний *E. coli* путем селекции на антибиотике дополнительно проводился селективно-специфичной ПЦР (рис. 2). Из трансформированных *E. coli* был выделен вектор pB1121 со вставкой анти-миР и проведена трансформация компетентных клеток *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА 105. В результате селективного посева на YEP-среде с тетрациклином и рифампицином (в равных концентрациях по 50 мг/мл каждого) были получены колонии трансформированных *Agrobacteria*. С полученными клонами проводили ПЦР-проверку на наличие в векторе целевой вставки с использованием праймеров к конструкции анти-миР775А. Результаты проверки клонов оценивали с использованием электрофореза в 2 % агарозном геле с бромистым этидием.

Полученные колонии трансформированной *Agrobacteria* могут быть использованы при создании линии мутантных растений со сниженным содержанием зрелой микроРНК775А, что позволяет провести полноценные исследования механизмов адаптации к стрессу с помощью РНК-интерференции посредством микроРНК775А. Подобные уникальные мутантные линии служат не только примером успешной модификации растений с применением естественных инструментов регуляции растительной клетки, но и ценным объектом для изучения различных метаболических путей. Оценка особенностей регуляции метаболизма углеводного и липидного обменов, осуществляемая путем РНК-интерференции при участии микроРНК775А, позволит создавать линии растений устойчивые к гипоксическим условиям и большей биопродуктивностью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023–2025 годы, проект № FZGU-2023–0009

Литература

- Graciet E. et al. Emergence of new regulatory mechanisms in the Benson-Calvin pathway via protein-protein interactions: a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/phosphoribulokinase complex // *Journal of Experimental Botany*. 2004. V. 55. P.1245–1254. (2)
- Noack L.C., Jaillais Y. Functions of anionic lipids in plants / L.C. Noack, Y. Jaillais // *Annu Rev Plant Biol.* – 2020. – V.71. – P. 71–102. (4)
- Sn-Glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants / X. Chen, L.S. Crystal, M. Truksa, S. Shah, J.W. Randall // *Plant Signal Behav.* – 2011. – V.6(11). – P. 1695–1699. (5)
- Lipid signalling in plant responses to abiotic stress / Q. Hou [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2016. – V.39. – P. 1029–1048. (3)
- A Resource for Inactivation of MicroRNAs Using Short Tandem Target Mimic Technology in Model and Crop Plants / T. Peng [et al.] // *Mol Plant.* – 2018. – V. 11. – P. 1400–1417.

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМЕРДЕСТРУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

¹ А.С. Шелковникова, ^{1,2} Е.В. Сордонова, ^{1,2} Г.П. Ламажапова

¹ Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, г. Улан-Удэ, Россия

² Бурятский государственный университет имени Д. Банзарова, г. Улан-Удэ, Россия

Почвенные микроорганизмы эволюционно направлены на приспособление к изменяющимся условиям окружающей среды. Появление новых нетипичных химических соединений, в основном «продуктов цивилизации», требуют от деструкторов приспосабливаться к их переработке, усиливать ферментные системы, способных к разрыву сложных химических связей, их окислению или восстановлению до простых биоразлагаемых соединений. Данное свойство почвенных бактерий, в настоящее время широко используется в создании препаратов для утилизации или переработки промышленных и бытовых отходов: получение микробных и ферментных препаратов.

Изучение механизмов деградации синтетических полимеров затруднено из-за их низкой скорости протекания процессов биокоррозии. Время жизни этих полимеров в природных условиях составляет десятки и сотни лет. Поэтому даже начальные результаты биокоррозии можно обнаружить только после длительного воздействия микроорганизмов, измеряемого неделями или месяцами.

Фактический процесс биodeградации пластика можно разделить на 4 этапа:

- 1) Биodeградация заключается в изменении свойств полимера, она изменяет свойства полимеров и способствует дальнейшей деградации;
- 2) Биофрагментация, приводящая к гидролизу и деградации углеродных цепей полимера и высвобождению промежуточных продуктов деградации;
- 3) Биоассимиляция, при которой метаболиты небольших углеводородных фрагментов метаболизируются клетками и включаются в микробную биомассу;
- 4) Минерализация: пластик полностью преобразуется в углекислый газ и воду [1].

Существует ряд методов, позволяющих надежно документировать изменения, происходящие в полимерах на каждом этапе. Первоначальная информация об изменениях, происходящих на пластиковых поверхностях, может быть получена с помощью различных видов микроскопии. Другие методы также могут быть использованы для изучения изменений в структуре пластмасс. Некоторые методы, например проверка образцов пластика, инкубированных в присутствии микробных культур, на изменение его механических свойств (прочность на разрыв, удлинение при разрыве модуль упругости и предел текучести).

Биоассимиляция пластика определяется по увеличению выхода биомассы клеток в культуре, растущей в присутствии пластика, например, по определению количества образовавшегося клеточного белка в сравнении с контролем.

Несмотря на трудоемкость исследований и сложность получения достоверных результатов, в последние два десятилетия появилось большое количество экспериментальных работ, демонстрирующих микробную деградацию пластиков, появилось большое количество экспериментальных работ. Биodeградация полиэтилена микроорганизмами была описана в ряде работ, опубликованных за последние 30 лет, и сейчас является одной из основных тем исследований в области разложения пластиков [2–5], общепризнанным является тот факт, что процесс биodeградации в нормальных условиях протекает чрезвычайно медленно. Ученые выяснили, что ПЭ, имеющий простую линейную структуру, чрезвычайно устойчив к биоразложению. Низкая скорость биоразложения ПЭ связана также с высокой гидрофобностью (в состав молекул входят только –CH₂-группы) и высокой молекулярной массой (более 30 кДа), что препятствует его транспорту непосредственно в клетки [6]. В случае, когда ПЭ был единственным источником энергии для микроорганизмов, фрагменты меньшего размера использовались быстрее, чем более крупные [7]. Для достижения значимой степени биоразложения за разумный период времени средняя молекулярная масса полиэтилена должна быть ниже 5000 Да [8].

Объектами исследований явились почвенные микроорганизмы, полученные в результате смывов с полиэтиленовых пленок, изъятых из почвы, засоренной полимерами.

Наиболее распространённый полимер для бытовых нужд – полиэтилен. В зависимости от метода получения производят несколько типов полиэтилена: низкой плотности (ПЭНП), полиэтилен высокой плотности (ПЭВП), сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ). ПЭНП отличается сильно разветвленными цепями со степенью полимеризации ~50000, плотностью 910–935 кг/м³ и степенью кристалличности 50–60 %. ПЭВП представляет собой плотный полимер, молекулы которого линейны и степень полимеризации составляет до 300000, с плотностью 930–970 кг/м³ и степенью кристалличности 70–85 % [9].

Мы рассмотрели механизмы и методы детекции биокоррозии на примере полиэтилена высокой плотности, толщиной 25 мкм (ГОСТ 16377–77) и 200 мкм (ГОСТ 10354–82).

Полиэтилены как низкой (ПЭНП), так и высокой плотности (ПЭВП) широко используются и востребованы практически на всех промышленных, сельскохозяйственных или бытовых рынках, главным образом, для упаковки товаров.

Для оценки биокоррозии нами были использованы следующие физико-химические методы: измерение потери веса, анализ пределов прочности при растяжении и изменение гидрофобности.

Чистые культуры выводили методом последовательного разведения, с последующим пересевом на чашки Петри в среду МПА. Посев проводили поверхностным методом, распределяя посевной материал по стерильной среде стерильным стеклянным шпателем.

Культивирование для максимального обрастания микробной пленкой проводили в жидкой среде МПБ с внесением кусочков полиэтилена размером 20 на 30 мм с взвешенной массой точностью до 0,00001 г. на аналитических весах. Культивирование проводилось в термостате при 30 °C в течение 30 суток. У образца номер 4 изменений в массе полиэтиленовой пленки толщиной 25 мкм не произошло, данные не анализировались.

В данном эксперименте удалось выделить 6 чистых культур и 4 смешанные, неразделяемые культуры.

Анализ выделенных культур показал наличие колоний характерных почвенных микроорганизмов: палочки разных форм, кокки, грибы и т. д. Основные характеристики выделенных колоний микроорганизмов представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1 – Основные морфологические признаки почвенных микроорганизмов на твердых питательных средах (разведение 10⁵)

Характеристика	Номер культивируемой колонии									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Размер, мм	30	20	5–6	6–7	4	2–4	20	3–5	20	4–5
Цвет	с/б	с/б	ж	с/б	с/б	с/б	с/б	с/б	с/б	с/б
Форма колоний	круглая	бесформенная								
Поверхность	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Структура	однородная									
Консистенция	не тягучая, не вязкая					тягучая, вязкая	не тягучая, не вязкая			

Примечание: с/б-светло-бежевый, ж-желтый, S-круглые с гладкой поверхностью колонии

Неразделенные смешанные колонии микроорганизмов при дальнейших разведениях не образовали чистых изолированных колоний, исходя из этого мы выбрали 5 чистых изолированных культур. Характеристика морфологических признаков представлена в таблице 2.

Образцы номер 2 и 5 показали наименьшее изменение массы пленок за 30 суток инкубирования толщиной 200 мкм. На основании полученных данных нами были отобраны образцы под номерами 3, 8, 10.

Исследование влияния микроорганизмов на поверхность полиэтиленовых пленок полностью погруженных в культуральную жидкость с монокультурами № 3, 8, 10 проводили в течение 60 суток, и с взятием образцов через 30 суток. Пленки 25 и 200 мкм размерами 20×30 и 20×20 мм взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,00001. По прошествии 30 и 60 суток образцы стерильно достали из культуральных сред, обработали 96 %-м этиловым спиртом, высушивали и обрабатывали раствором бихромата калия в серной кислоте. Обработка бихроматом калия в серной кислоте позволила очистить полиэтилен от микробного обрастания. Подсушенные полиэтиленовые пленки повторно взвешивали.

Таблица 2 – Характеристика микроорганизмов, образовавших изолированные колонии при инкубации на МПА 24 ч, 30 °С

Характеристики микроорганизмов	Номер изолированной колонии				
	2	3	5	8	10
Рост	Ровный по штриху	Ровный по штриху	Разрозненный	Ровный по штриху	Равномерный по штриху
Цвет	с/б	ж	с/б	с/б	с/б
Форма микроорганизмов	Закругленные палочки	Палочки	Вытянутые палочки	Палочки дуплеты	Удлиненные палочки
Окраска по Граму	+	–	+	+	–

Примечание: с/б-светло-бежевый, ж-желтый

Нами обнаружено достоверное снижение массы исследуемых пленок под воздействием культур под номерами 3, 8, 10. Для всех образцов тестируемых полимеров характерно обрастание микробной пленкой поверхности полимера. Микробная биопленка глубоко проникает в полимер, что затрудняет его отделение даже при использовании 5 %-ного раствора бихромата калия в серной кислоте.

Следует отметить, что сама по себе потеря веса полимера не может служить надежным критерием его биодegradации, поскольку состав пластиков, очень гетерогенен, и часть компонентов может теряться при воздействии факторов внешней среды независимо от присутствия микроорганизмов. Поэтому данный показатель должен обязательно дополняться другими методами тестирования, при этом тестируется степень degradation полимера, а также активность ферментной системы микроорганизма. Для оценки роста микробной массы монокультур 3, 8, 10 нами было проведено инкубирование на солесодержащей синтетической среде с кусочками полиэтилена и вазелина в качестве единственных источников углерода. Инкубирование исследуемых культур микроорганизмов на жидкой синтетической среде, где в качестве единственного источника углерода были кусочки полиэтилена показали накопление биомассы монокультур (3, 8, 10) с измельченными кусочками полиэтилена в качестве единственного источника углерода. Наибольшее увеличение оптической плотности наблюдалось у культур микроорганизмов образцов № 8 и 10.

Исследовано наличие каталазной, липолитической, протеолитической активностей, способность к выделению сероводорода, аммиака у монокультур 3, 8 и 10. При этом фосформинерализующие свойства для них не характерны. На основании изученности морфофункциональных характеристик выделенных монокультур бактерий по определителю Берджи данные микроорганизмы предположительно можно отнести к роду *Proteus*.

В результате проведенного исследования, можно сделать вывод о том, что при культивировании монокультур почвенных микроорганизмов на поверхности полиэтиленовых пленок происходят процессы деструкции полимеров, разрыхляющие и меняющие физические свойства полиэтилена.

Литература

1. Плакунов В.К., Ганнесен А.В., Мартянов С.В., Журина М.В. Биокоррозия синтетических пластмасс: механизмы degradation и способы защиты // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – С. 631.
2. Ammala A. et al. An overview of degradable and biodegradable polyolefins // Prog. Polym. Sci. – 2011. – V. 36. – P. 1015–1049.
3. Harrison J.P., Boardman C., O'Callaghan K., Delort A.M., Song J. Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: A critical review // R. Soc. Open Sci. 2018. V. 5. Art. 171792.
4. Sen S., Raut S. Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review // J. Environ. Chem. Eng. 2015. V. 3. P. 462–473.
5. Shah A.A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review // Biotechnol. Adv. 2008. V. 26. P. 246–265.
6. Sivan A., Szanto M., Pavlov V. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. P. 346–352.
7. Kawai F., Watanabe M., Shibata M., Yokoyama S., Sudate Y., Hayashi S. Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi // Polym. Degrad. Stab. 2004. V. 86. P. 105–114.
8. Reddy M.M., Deighton M., Gupta R.K., Bhattacharya S.N., Parthasarathy R. Biodegradation of oxo-biodegradable polyethylene // J. Appl. Polym. Sci. 2009. V. 111. P. 1426–1432.
9. Галыгин В.Е., Баронин Г.С., Таров В.П., Завражин Д.О. Современные технологии получения и переработки полимерных и композиционных материалов. – Тамбов: Изд-во ФГБОУ ВПО "ТГТУ", 2012. – 180 с.

СТРУКТУРА АЭРОБНОГО ГАЛОФИЛЬНОГО МЕТИЛОТРОФНОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ГИПЕРГАЛИННОГО ОЗЕРА ДУНИНО ИЗ ГРУППЫ СОЛЬ-ИЛЕЦКИХ ОЗЕР (ОРЕНБУРГСКАЯ ОБЛАСТЬ)

М.Н. Шустова^{1,2}, Е.Н. Капарулина¹, Н.В. Доронина¹

¹ ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушкино, Россия

² Пушкинский филиал РОСБИОТЕХ, Пушкино, Россия

Гипергалинные озера повсеместно распространены на нашей планете и среди них можно выделить группу Соль-Илецких соленых озер, располагающихся в Оренбургской области. Соль-Илецкие озера имеют карстово-антропогенное происхождение, и соленость некоторых озер приближается к 300 г/л NaCl (озеро Дунино). Изучение микробиоты Соль-Илецких озер проводилось на протяжении многих лет (Селиванова с соавт., 2018). Однако, мало известно о распространении в этих биотопах аэробных метилотрофных бактерий, использующих метанол и другие C₁-соединения в качестве источников углерода и энергии и играющих важную биосферную роль.

Цель работы – изучение структуры галофильного метилотрофного микробного сообщества озера Дунино.

Из образца воды, отобранного из озера Дунино на территории г. Соль-Илецка, на минеральной среде «MAMS» с 6 % NaCl и 0,5 % метанола, в качестве источника углерода и энергии, после более десяти пассажей получили устойчивое аэробное галофильное метилотрофное микробное сообщество, которое стало объектом дальнейших исследований. Получить чистые культуры галофильных метилотрофных бактерий не удалось, поскольку на агаризованной среде колонии были представлены ассоциатами метилотрофов с гетеротрофными организмами.

С помощью 16S метагеномного секвенирования определили биоразнообразие аэробного галофильного метилотрофного микробного сообщества. Оценка удельной численности прокариот на уровне рода выявила доминирование представителей метилотрофного рода *Methylophaga* (92,93 %) и неметилотрофных родов *Halomonas/Vreelandella* (6,65 %), *Marinobacter* (0,28 %), а также присутствие менее 0,1 % представителей родов *Ochrobactrum*, *Oceanicola*, *Brevundimonas*, *Vitellibacter*, *Pseudomonas* и *Achromobacter*. Анализ последовательностей гена 16S рПНК, полученных в ходе метагеномного исследования показал, что метилотрофные представители сообщества близки *Methylophaga* sp. DICA-051 (OQ055065) из образца Восточно-Китайского моря.

На богатой агаризованной среде LB с 3 % NaCl из ассоциата выделили гетеротрофный штамм 3Sol, который на основании секвенирования гена 16S рПНК имел 99,72 % сходства с *Vreelandella titanicae* VN1^T. Штамм 3Sol растет при 0,25 – 27 % NaCl (оптимально при 3–8 %), pH 5,5 – 10 (оптимально при 7,4) и оптимальной температуре 29 °C. В качестве источников углерода и энергии использует оргкислоты, сахара, спирты.

Для дальнейшего изучения взаимодействия микроорганизмов внутри сообщества создали искусственный ассоциат, содержащий чистую культуру галофильного метилотрофа *Methylophaga marina* и штамм 3Sol. В отличие от метилотрофа, представленного в ассоциате озера Дунино, чистая культура *M. marina* хорошо растет на агаризованной среде «MAMS» с метанолом. В ходе совместного культивирования (более десяти пассажей) проведено микроскопирование, высев на селективные питательные среды, анализ метаболитов в культуральной жидкости. Микроскопия культуральной жидкости из экспоненциальной фазы роста созданного ассоциата показала наличие двух видов клеток, активно делящихся, без признаков лизиса. Оба вида в искусственном ассоциате, обнаруживались при высевах на агаризованные среды после большого количества пассажей. Анализ культуральной жидкости методом ВЭЖХ выявил при культивировании чистой культуры *Methylophaga marina* образование формиата (продукта окисления метанола), причем в культуральной жидкости при культивировании искусственного ассоциата концентрация формиата в культуральной среде возрастала в 6 раз. Наряду с этим, наблюдали накопление метилотрофом ацетата и незначительных количеств некоторых кислот цикла Кребса.

Вероятно, формиат и ацетат, образуемые метилотрофом рода *Methylophaga* из метанола, поддерживают рост гетеротрофа *Vreelandella* sp. 3Sol.

**БИОСИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ЕЁ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ
С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ****П.А. Горбатова^{1,2}**¹ Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН, г. Бийск, Россия² Бийский технологический институт (филиал) «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», г. Бийск, Россия

Наноцеллюлоза представляет собой новый вид биоразлагаемых материалов с наноразмерной структурой, который может быть использован в биомедицине, фармацевтике и технических областях. Наноцеллюлоза представлена тремя разновидностями: кристаллами наноцеллюлозы, фибриллами наноцеллюлозы и бактериальной наноцеллюлозой (БНЦ) в зависимости от структуры и источников целлюлозы. Термин БНЦ применим ко всей целлюлозе, полученной в результате микробиального синтеза, поскольку микроорганизмы создают структуры целлюлозы только на наноуровне. В отличие от БНЦ, производство кристаллов и фибрилл наноцеллюлозы, включает в себя на первом этапе извлечение целлюлозы из природных целлюлозосодержащих источников, а затем кислотный гидролиз и механическую дезинтеграцию целлюлозы, соответственно. Производство БНЦ представляет собой процесс «снизу-вверх», который включает в себя использование богатых органикой субстратов для синтеза БНЦ без дополнительных этапов обработки целлюлозы для получения наноразмерной структуры [1].

БНЦ химически эквивалентна растительной целлюлозе, но обладает высокой степенью кристалличности, высокой степенью полимеризации и высокой химической чистотой (не содержит лигнина, гемицеллюлоз, пектина), а также уникальной трехмерной сетчатой структурой из нановолокон целлюлозы. Уникальная структура придает БНЦ отличные свойства, включая высокую прочность на растяжение во влажном состоянии, большую площадь поверхности, высокую влагоудерживающую способность и эластичность. Эти преимущества делают БНЦ идеальным кандидатом в качестве возобновляемых источников целлюлозных материалов [2].

Процесс биосинтеза БНЦ представляет собой ферментацию различных гидролизатов определенными видами бактерий. К ним относятся *Acetobacter* (*Komagataeibacter*), *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Achromobacter* [3]. В основном в качестве микроорганизмов-продуцентов БНЦ используются индивидуальные штаммы, однако для них характерно спонтанное снижение способности синтезировать целлюлозу и заметное снижение продуктивности в промышленных условиях, особенно это относится к генно-инженерным штаммам. Поэтому выдвинута концепция использования микробных консорциумов, адаптивность которых повышается за счет синергетического воздействия на общий обмен веществ. Симбиотическая культура *Medusomyces gisevii*, производящая целлюлозу, демонстрирует адаптивность, способность функционировать в экстремальных условиях и устойчивость к загрязнению [4, 5].

Широкому внедрению БНЦ препятствует ее высокая себестоимость. Одним из путей снижения себестоимости производства является использование дешевого сырья. Среди последних тенденций – концепция производства БНЦ с использованием растительного сырья для получения питательных сред из ферментативного гидролизата предварительно обработанного сырья. В качестве претендентов для получения субстратов активно рассматривается мискантус [6, 7] и шелуха овса [4]. Важным аспектом является правильный выбор целлюлозосодержащего сырья. Мискантус – энергетическая культура, занимающая одно из лидирующих мест в мире среди целлюлозного сырья [8–11]. Как и любой другой тип целлюлозного сырья, мискантус состоит из целлюлозы, гемицеллюлоз, лигнина, жировой фракции и минеральных компонентов, которые все прочно связаны друг с другом, образуя композитную матрицу. Предварительная обработка целлюлозного сырья является ключевым этапом, определяющим успешность последующих стадий ферментативного гидролиза и микробиального биосинтеза [6, 12].

Нативная БНЦ обычно модифицируется для улучшения функциональных свойств [13], при этом химические модификации происходят в реакциях между гидроксильными группами БНЦ и соответствующими химическими веществами. Продукты модификации могут быть использованы в качестве передовых материалов для получения пленок, носимых датчиков, целлюлозных наносфер, аэрогелей, гидрогелей и нанокомпозитов. Перспективным направлением химической функционализации БНЦ является ее нитрование [14].

Гибкие физические датчики в настоящее время привлекают все большее внимание из-за их широкого применения в мониторинге движения человека и персонализированной медицине. Такие датчики реагируют на физические, химические и биологические изменения и преобразуют их в измеряемые или регистрируемые сигналы. БНЦ может выступать в качестве субстрата в сочетании с активными материалами, которые широко используются в областях, связанных с датчиками и накоплением энергии. Основными преимуществами БНЦ как субстрата являются возобновляемость, биоразлагаемость, биосовместимость, гибкость, механическая прочность, большой удельной площадью поверхности и наноразмерные волокна. Для создания сенсорных материалов применяют, как нативную БНЦ, так и производные на ее основе, которые получают, в частности, методами химической функционализации, такими как окисление, гидротермический синтез и нитрование. В результате реакции нитрования в синтезированных нитратах БНЦ происходит преобразование полярности, что в ходе анализа усиливает межфазную связь между субстратом и анализируемым материалом посредством ковалентных связей [15].

Анализ публикаций [16–20] показывает возможность синтеза нитратов БНЦ с удовлетворительными функциональными свойствами целевых нитратов, что позволяет рассматривать БНЦ в качестве перспективного прекурсора нитратов целлюлозы (НЦ). Отличия между нитратами БНЦ и НЦ на основе растительной целлюлозы заключаются в высоких показателях вязкости, что обусловлено высокой степенью полимеризации БНЦ, и наноразмерной сетчатой структуре, которая сохраняется после нитрования БНЦ.

Нитроцеллюлозные мембраны на основе НЦ с микромасштабными пористыми структурами нашли широкое применение в биомедицинских областях, в основном благодаря своей превосходной биосовместимости, уникальным физико-химическим свойствам, например, соответствующий размер пор, большая площадь поверхности, и способность иммобилизовать различные биомолекулы. Нитроцеллюлозные мембраны обычно используются для иммобилизации нуклеиновых кислот в саузерн- и нозерн-блоттинге, а также для иммобилизации белков в вестерн-блоттинге. Они также широко используются в качестве субстратных материалов в различных диагностических устройствах, где происходит связывание антигена с антителом или гибридизация нуклеиновых кислот. В этих биомедицинских областях диффузия, конвекция и реакция связывания биомолекул в НЦ посредством капиллярного потока являются фундаментальным физическим процессом. Капиллярный поток зависит от параметров, характеризующих морфологию пор: пористости и размера пор [21–23].

Жидкие нитроцеллюлозные бинты с нанопорами эффективны при заживлении ран, особенно для ран в труднодоступных местах. Нанопористость показала улучшенный антибактериальный эффект и нетоксичность для самой раны. После нанесения нитроцеллюлозный бинт быстро высыхает, образуя пленку, и обеспечивает водонепроницаемую защиту кожи [24]. Воздухопроницаемость нитроцеллюлозных пленок может быть повышена при смешивании нитроцеллюлозы и нанопористого графена: полученные композитные мембраны демонстрируют превосходные антибактериальные свойства широкого спектра действия и снижают риск микробной инфекции для организма после травмы [25].

В работе [26] описана возможность применения НЦ в качестве компонента для изготовления магнитных микрогранул. Для получения нового и недорогого магнитного носителя используются НЦ и магнетит в качестве полимера и магнитного материала, соответственно. Технология магнитных носителей нашла широкое применение в качестве адсорбентов для селективного извлечения из жидкостей, содержащих другие взвешенные твердые частицы, очистки сточных вод посредством электростатической адсорбции, магнитных носителей для иммобилизованных или адсорбированных ферментов и белков, а также для использования при подготовке иммунологических анализов.

Новым направлением для изучения и разработки является применение НЦ в системе доставки лекарств для лечения пародонтита. Система формирующегося *in situ* геля основана на индуцированной водой инверсии фаз, первоначально она включает полимерный раствор, содержащий препарат, который превращается в гелеобразную или твердую матрицу после инъекции и воздействия водной жидкости. НЦ представляют собой эфиры целлюлозы, которые нерастворимы в воде, но растворимы в полярных растворителях, что делает НЦ перспективным полимером для использования в системе формирующегося *in situ* геля [27]. Тот же принцип лечения, но с использованием более концентрированных растворов НЦ, содержащих левофлоксацин и салициловую кислоту, представлен авторами [28] для лечения акне.

Таким образом, нитрование БНЦ открывает новые высокотехнологичные области применения в медицине: многочисленные диагностические мембраны, бинты для заживления ран в труднодоступных местах, магнитные носители, гели для доставки лекарств для лечения пародонтита и акне. Важно отметить, что научная гипотеза о биосинтезе БНЦ из ферментативных гидролизатов предварительнообработанного целлюлозосодержащего сырья [5] в качестве прекурсора НЦ значительно обосновывает снижение стоимости уникального полимера и расширяет возможности наноразмерных НЦ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107>

Литература

1. Wang Y., Wang, Z., Lin, Y., et al. Nanocellulose from agro-industrial wastes: A review on sources, production, applications, and current challenges // *Food Research International*. – 2024. – P. 114741. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114741>.
2. Zhong C. Industrial-scale production and applications of bacterial cellulose // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 605374. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>.
3. Katyal M., Singh R., Mahajan R., et al. Bacterial cellulose: Nature's greener tool for industries // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2023. – Vol. 70. – № 5. – P. 1629–1640. DOI: <https://doi.org/10.1002/bab.2460>.
4. Skiba E.A. et al. Biosynthesis of bacterial nanocellulose from low-cost cellulosic feedstocks: effect of microbial producer // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 18. – P. 14401. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241814401>.
5. Digel I. et al. Bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* on glucose and sucrose: biosynthesis and structural properties // *Cellulose*. – 2023. – Vol. 30. – № 18. – P. 11439–11453. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2607212/v1>.
6. Kashcheyeva E.I., Korchagina A.A., Gismatulina Y.A., et al. Simultaneous production of cellulose nitrates and bacterial cellulose from lignocellulose of energy crop // *Polymers*. – 2024. – Vol. 16. – P. 42. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym16010042>.
7. Sukhikh S., Babich O., Ivanova S., et al. Production of nanocellulose from miscanthus biomass // *Current research in green and sustainable chemistry*. – 2024. – P. 100412. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2024.100412>.
8. Liu W.; You L.; Wang S.; et al. Screening of Miscanthus Genotypes for Sustainable Production of Microcrystalline Cellulose and Cellulose Nanocrystals // *Agronomy*. – 2024. – Vol. 14. – P. 1255. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy14061255>.
9. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Skiba E.A., et al. Review of Current Prospects for Using Miscanthus-Based Polymers // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – P. 3097. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym15143097>.
10. Mironova G.F., Budaeva V.V., Skiba E.A., et al. Recent Advances in Miscanthus Macromolecule Conversion: // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 16. – P. 13001. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241613001>.
11. Dorogina O.V. et al. Identification of Populations by ISSR Markers and a Histochemical Determination of Transient Starch in Species of the Genus *Miscanthus* Anderss // *Contemporary Problems of Ecology*. – 2023. – Vol. 16. – № 1. – P. 67–75. DOI: [10.1134/S199542552301002X](https://doi.org/10.1134/S199542552301002X).
12. Skiba E.A., Shavyrkina, N.A., Yang, F., et al. Complete Cycle from Feedstock *Miscanthus Giganteus* to Target Product Bacterial Nanocellulose // *Advances in Engineering Technology Research*. – 2024. – Vol. 10. – № 1. – P. 375–375. DOI: <https://doi.org/10.56028/aetr.10.1.375.2024>.
13. Stumpf T.R., Yang X., Zhang J., et al. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering // *Materials Science and Engineering: C*. – 2018. – Vol. 82. – P. 372–383. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.121>.
14. Zhang Y., Deng W., Wu M., et al. Tailoring functionality of nanocellulose: current status and critical challenges // *Nanomaterials*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1–22. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano13091489>.
15. Huang J., Zhao M., Hao Y., et al. Recent advances in functional bacterial cellulose for wearable physical sensing applications // *Advanced Materials Technologies*. – 2022. – Vol. 7. – № 1. – P. 2100617. DOI: <https://doi.org/10.1002/admt.202100617>.
16. Nursyafiqah J.R. et al. Response surface methodology for optimization of nitrocellulose preparation from nata de coco bacterial cellulose for propellant formulation // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10. – № 4. – P. e25993. DOI: [10.1016/j.heliyon.2024.e25993](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25993).
17. Sun D.P., Ma B., Zhu C.L., et al. Novel nitrocellulose made from bacterial cellulose // *Journal of Energetic Materials*. – 2010. – Vol. 28. – № 2. – P. 85–97. DOI: <https://doi.org/10.1080/07370650903222551>.
18. Gismatulina Yu. A. Promising energetic polymers from nanostructured bacterial cellulose // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – № 9. – P. 2213. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym15092213>.
19. Budaeva V.V., Gismatulina Y.A., Mironova G.F., et al. Bacterial nanocellulose nitrates // *Nanomaterials*. – 2019. – Vol. 9. – № 12. – P. 1694. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano9121694>.
20. Горбатова П.А., Корчагина А.А., Гисматулина Ю.А. и др. Свойства нитратов целлюлозы, полученных нитрованием бактериальной целлюлозы с использованием смеси азотной и серной кислот // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2024. – Т. 14. – № 2. – С. 236–244. DOI: <https://doi.org/10.21285/achb.915>.
21. Sun S., Feng S., Ji C., et al. Microstructural effects on permeability of Nitrocellulose membranes for biomedical applications // *Journal of Membrane Science*. – 2020. – Vol. 595. – P. 117502. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117502>.
22. Chen J.L., Njoku D.I., Tang C., et al. Advances in Microfluidic Paper Based Analytical Devices (μPADs): Design, Fabrication, and Applications. *Small Methods*. 2024. P. 2400155. DOI: <https://doi.org/10.3390/mi7050086>.
23. Tang R., Xie M.Y., Li M., et al. Nitrocellulose membrane for paper-based biosensor // *Applied Materials Today*. – 2022. – Vol. 26. – P. 101305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101305>.
24. Mu X. et al. Nano-porous nitrocellulose liquid bandage modulates cell and cytokine response and accelerates cutaneous wound healing in a mouse model // *Carbohydrate polymers*. – 2016. – Vol. 136. – P. 618–629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.070>.
25. Du S. et al. A nanoporous graphene/nitrocellulose membrane beneficial to wound healing // *ACS Applied Bio Materials*. – 2021. – Vol. 4. – № 5. – P. 4522–4531. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00261>.
26. Tanyolaç D., Özdural A.R. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads // *Reactive and Functional Polymers*. – 2000. – Vol. 45. – № 3. – P. 235–242. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00037-7).
27. Senarat S., Rojviriyi C., Sarunyakasitrin K., et al. Moxifloxacin HCl-incorporated aqueous-induced nitrocellulose-based in situ gel for periodontal pocket delivery // *Gels*. – 2023. – Vol. 9. – № 7. – P. 572. DOI: <https://doi.org/10.3390/gels9070572>.
28. Khaing E.M., Jitrangri K., Chomto P., Phaechamud T. Nitrocellulose for prolonged permeation of levofloxacin HCl-salicylic acid in situ gel // *Polymers*. – 2024. – Vol. 16. – № 989. <https://doi.org/10.3390/polym16070989>.

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ *MISCANTHUS X GIGANTEUS* СОРТА КАМИС РОССИЙСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

А.А. Зенкова^{1,2}

¹ Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН, г. Бийск, Россия

² Бийский технологический институт (филиал) Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, г. Бийск, Россия

Введение. Бактериальная наноцеллюлоза представляет собой линейный, неразветвленный экзополисахарид, его сверхтонкие нанофибриллы сплетаются и удерживаются вместе меж- и внутримолекулярными водородными связями. Глюкоза с ее отличительной структурой и связями служит основным строительным блоком бактериальной наноцеллюлозы. Гидроксигруппы наделяют бактериальную наноцеллюлозу химически реактивной поверхностью, обеспечивая такие процессы, как этерификация, и ацилирование. В бактериальной наноцеллюлозе отсутствуют такие примеси, как лигнин, гемицеллюлозы и пектин, которые обычно встречаются в целлюлозе из растительных источников и требуют энергоемких стадий очистки [1].

Бактериальная целлюлоза обладает превосходными физико-химическими и механическими свойствами. Благодаря величине нановолокна с шириной менее 100 нм она обладает целым рядом уникальных свойств: высокой степенью полимеризации, высокой кристалличностью, биосовместимостью, эластичностью, высокой прочностью на разрыв, долговечностью, возобновляемостью, высокой степенью биоразлагаемости, она нетоксична и неаллергенна, легко изолируется и очищается благодаря тому, что синтезируется без гемицеллюлоз, пектинов и лигнина [2].

Бактериальная наноцеллюлоза имеет множество применений, например, в виде упаковки в пищевой промышленности, в производстве оптически прозрачной бумаги, подходящей для подложек, используемых в производстве электронных устройств, таких как солнечные батареи и гибкие дисплеи [3]. Применяется для производства мембран, которые используют для очистки сточных вод [4], используется в биомедицине для каркаса кровеносных сосудов [5].

Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы очень трудоемкий и дорогостоящий процесс. На данный момент уже известно множество альтернативных питательных сред, которые способны заменить синтетические среды на основе глюкозы. Для получения бактериальной наноцеллюлозы в качестве источника углерода и азота описано использование гидролизатов растений, промышленных гидролизатов древесины, торфа, щелоков целлюлозно-бумажного производства, нестандартного сырья плодово-ягодных производств [6]. Лигноцеллюлозная биомасса является наиболее распространенным и возобновляемым ресурсом на земле, обеспечивая богатый незерновой субстрат для производства биопродуктов [7].

Главной задачей данной работы является получение наноразмерной бактериальной целлюлозы из растительной целлюлозы, выделенной из мискантуса гигантского сорта КАМИС. Данная культура выбрана в связи с тем, что в глобальных масштабах это массовая техническая культура с повышенным содержанием целлюлозы, промышленно применяется к примеру, при производстве бумаги недревесного происхождения [8].

Препятствием в использовании лигноцеллюлозного материала для биотехнологических целей является его устойчивая структура, требующая процесса предварительной обработки для деконструкции. Этап предварительной обработки направлен на повышение доступности целлюлозы и гемицеллюлозы путем разрушения водородных связей в структуре лигноцеллюлозы для эффективного гидролиза, который высвобождает сахара, необходимые для микробного использования [9].

Материалы и методы. В качестве сырья использовали мискантус гигантский сорт КАМИС, предоставленный ООО «Мастер Брэнд», г. Москва, Россия. Мискантус был предварительно обработан на опытном производстве в стандартном емкостном оборудовании объемом 250 л при атмосферном давлении. Для получения технической целлюлозы азотнокислым способом мискантус подвергали двухстадийной обработке по методике [10]. Первая стадия – обработка мискантуса 4 %-ным раствором азотной кислоты при температуре 90 – 96 °С и атмосферном давлении в течение 1–6 ч. Данная

обработка позволила получить продукт азотнокислой обработки. Полученный продукт отжимали на вакуум-филт্রে и промывали до нейтральной реакции. Вторая стадия – обработка продукта азотнокислой обработки мискантуса 4 %-ным раствором гидроксида натрия при температуре 90–96 °С и атмосферном давлении в течение 1–6 ч. Полученный продукт – техническую целлюлозу, полученную азотнокислым способом (ЦАС) – отжимали на вакуум-филт্রে и промывали до нейтральной реакции.

Нативный мискантус и ЦАС мискантуса подвергали ферментативному гидролизу согласно методике, описанной в [11]. Гидролиз проводили в течение 72 ч при постоянном перемешивании, при использовании следующих ферментативных препаратов: «Целлолюкс-А» (грибного происхождения, ООО ПО «Сиббиофарм, Россия) и, «Ультрафло-Коре» (продуцент *Trichoderma reesei*, «Novozymes A/S», Дания).

После того, как был получен ферментативный гидролизат ЦАС мискантуса, из него была приготовлена питательная среда для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы, биосинтез проводили по методике [12].

Результаты. Химический состав мискантуса и целлюлозы из него исследовали согласно [13], он приведен в таблице 1.

Таблица 1 – Химический состав мискантуса гигантского и целлюлозы из него

Субстрат	Массовая доля, %						
	α -целлюлозы	целлюлозы	пентозанов	лигнина	зола	ЖВФ	СП
Мискантус	–	54,00	22,80	21,00	1,70	0,48	–
ЦАС	88,20	–	1,80	1,08	0,27	–	1200

Примечание: ЦАС – техническая целлюлоза, полученная азотнокислым способом, ЖВФ – жировосковая фракция, СП – степень полимеризации.

В результате предварительной обработки азотнокислым способом в ЦАС содержание лигнина снизилось в 18 раз, содержание пентозанов снизилось в 11,8 раз, зольность снизилась в 6 раз, содержание целлюлозы увеличилось в 1,8 раза. Массовая доля целлюлозы невысока – 88,2 %, в то же время содержание нецеллюлозных примесей также низкое. В работе [10] из мискантуса сахароцветного азотнокислым способом в аналогичных условиях была получена техническая целлюлоза с массовой долей α -целлюлозы 91,0–94,0 % с выходом 25–26 %. В нашей работе выход технической целлюлозы мискантуса составил 22,5 %. Сниженное содержание целлюлозы и сниженный выход свидетельствует о «переваре» в условиях опытно-промышленного производства.

Результаты ферментативного гидролиза нативного мискантуса и технической целлюлозы мискантуса представлены на рисунке 1. Реакционная способность нативного мискантуса к ферментативному гидролизу оказалась крайне низкой, так как конечная концентрация редуцирующих веществ составила всего 0,6 г/л. Концентрация редуцирующих веществ технической целлюлозы мискантуса составила 20,0 г/л. Из полученных данных можно сделать вывод, что азотнокислая обработка мискантуса является очень эффективной, так как повышает конечную концентрацию редуцирующих веществ в 33 раза.

Из ферментативного гидролизата ЦАС мискантуса была приготовлена питательная среда для биосинтеза. В результате биосинтеза получен образец бактериальной наноцеллюлозы (начальная концентрация редуцирующих веществ 20,0 г/л), в качестве контроля получен образец бактериальной наноцеллюлозы на полусинтетической глюкозной питательной среде (начальная концентрация редуцирующих веществ 20,0 г/л). В инокуляте количество дрожжей составило $1,1 \times 10^6$ КОЕ/мл, уксуснокислых бактерий – $1,3 \times 10^6$ КОЕ/мл.

Начальная кислотность обеих питательных сред составила 5 ед. pH. После 10 суток биосинтеза на среде из мискантуса содержание дрожжей увеличилось до $2,7 \times 10^6$ КОЕ/мл, содержание уксуснокислых бактерий возросло до $3,0 \times 10^6$ КОЕ/мл, что подтверждает микробиологическую доброкачественность среды; кислотность среды составила 7,5 ед. pH, а концентрация редуцирующих веществ снизилась до 3 г/л. Выход бактериальной наноцеллюлозы составил 8,6 %, степень полимеризации целлюлозы – 1230 причем средняя ширина микрофибрилл составила 36 нм.

После биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы на контрольной полусинтетической глюкозной питательной среде в течение 10 суток содержание дрожжей $2,5 \times 10^6$ КОЕ/мл, уксуснокислых бактерий

$2,3 \times 10^6$ КОЕ/мл; кислотность среды составила 2,8 ед. рН, а концентрация редуцирующих веществ снизилась до 1,0 г/л. На контрольной среде выход бактериальной наноцеллюлозы выше, чем на гидролизной среде в 1,4 раза и составляет 11,8 %, степень полимеризации выше в 2,4 раза и составляет 3000. Но следует подчеркнуть, что ширина микрофибрилл на контрольной среде ниже, чем на гидролизной в 1,5 раза, и составляет 22 нм.

Морфология целлюлозы из мискантуса и бактериальной целлюлозы принципиально отличаются, растровая электронная микроскопия представлена на рисунке 2. Азотнокислый способ позволяет выделить из мискантуса микрофибриллы целлюлозы шириной 4,7–8,5 мкм, длиной 156,0–928,0 мкм, в основном микрофибриллы сохраняют параллельную укладку, характерную для микрофибрилл нативного мискантуса. Известно, что микрофибриллы являются основными элементами надмолекулярной структуры целлюлозы. Микрофибриллы собираются в более крупные агрегаты – фибриллы (макрофибриллы), в клеточной стенке фибриллы образуют тонкие слои – ламеллы, внутри которых фибриллы ориентируются в одном направлении. В разных слоях клеточной стенки ламеллы ориентированы в разных направлениях, благодаря чему клеточная стенка обладает высокой механической прочностью [14].

Фибриллы бактериальной наноцеллюлозы в 1000 раз меньше микрофибрилл растительных клеток, на рисунке 2 Б виден фрагмент трехмерной неупорядоченной структуры, характерной для этого наноматериала.

Таблица 2 – Сравнение свойств технической целлюлозы (ЦАС) мискантуса с бактериальной наноцеллюлозой.

Критерий сравнения	ЦАС мискантуса	Бактериальная наноцеллюлоза из ЦАС мискантуса
Степень полимеризации	1200	1230
Ширина микрофибрилл	4,7–8,5 мкм	36 нм
Длина микрофибрилл	156,0–928,0 мкм	мкм (невозможно измерить)
Массовая доля α -целлюлозы	88,20 %	$99,5 \pm 0,1$ % [15]

Данные таблицы 2 хорошо согласуются с литературными данными: бактериальная наноцеллюлоза наноразмерная и химически чистая, степень полимеризации образца бактериальной наноцеллюлозы полученный на среде на основе ферментативного гидролизата из технической целлюлозы совпадает со степенью полимеризации технической целлюлозы.

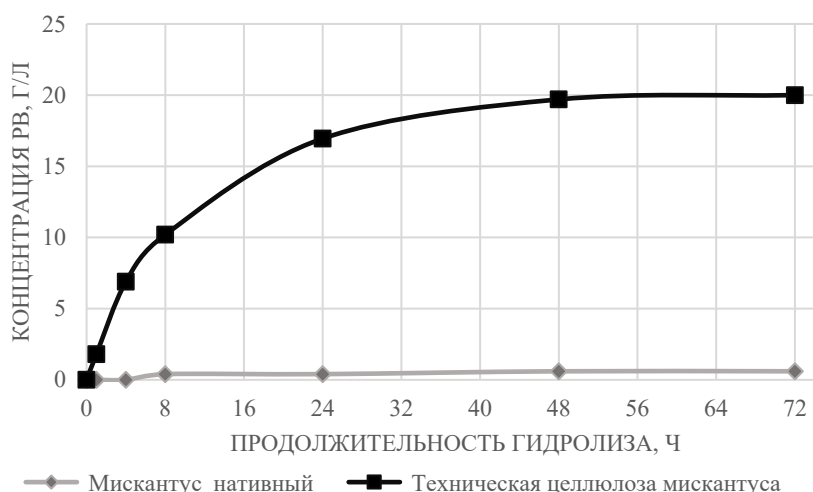
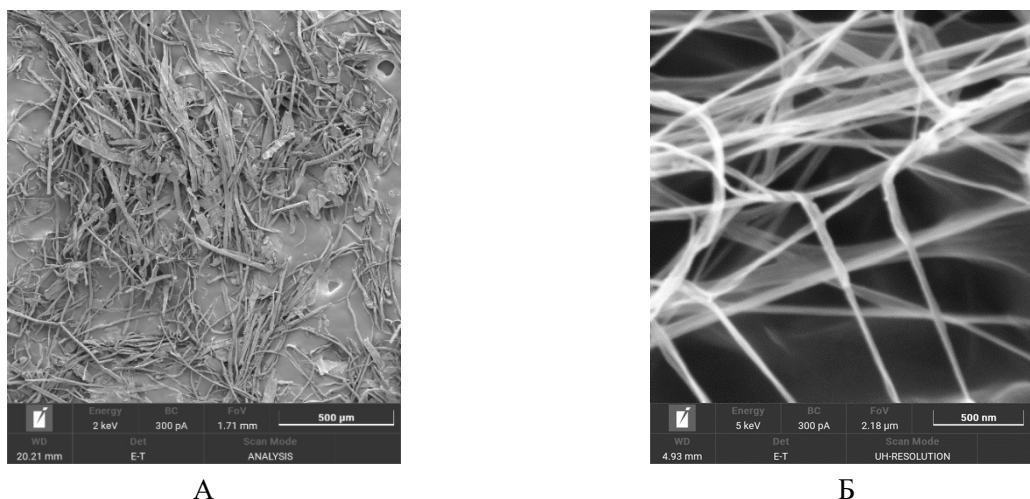


Рисунок 1 – Зависимость концентрации редуцирующих веществ от продолжительности ферментации



А

Б

Рисунок 2 – Растровая электронная микроскопия: А – технической целлюлозы мискантуса; Б – бактериальной наноцеллюлозы, полученной на питательной среде ферментативного гидролизата технической целлюлозы мискантуса

Выводы. В данной работе из мискантуса гигантского сорта КАМИС азотнокислым способом выделена техническая целлюлоза, которая в результате биотехнологического трансформации превращена в бактериальную целлюлозу с шириной микрофибрилл 36 нм.

Работа выполнена при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск) и за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>.

Литература

1. Acharyya P.P., et al. Recent advances in synthesis and bioengineering of bacterial nanocellulose composite films for green, active and intelligent food packaging // Cellulose. – 2024. – С. 1–25. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-024-06023-3>.
2. El-Naggar N.E.A., et al. Bacterial nanocellulose production using Cantaloupe juice, statistical optimization and characterization //Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13. – №. 1. – С. 51. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26642-9>.
3. Amorim J.D.P. et al. Plant and bacterial nanocellulose: Production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review //Environmental Chemistry Letters. 2020. Vol. 18. С. 851–869.
4. Sahari N.S. et al. Bacterial nanocellulose and its application in heavy metals and dyes removal: a review //Environmental Science and Pollution Research. – 2023. – Vol. 30. – №. 51. – С. 110069–110078. DOI: [10.1007/s11356-023-30067-w](https://doi.org/10.1007/s11356-023-30067-w).
5. Харченко А.В., Ступак В.В. Бактериальная наноцеллюлоза как пластический материал для закрытия дефектов твердой мозговой оболочки: обзор литературы // Хирургия позвоночника. – 2019. – Т. 16. – №. 3. – С. 62–73.
6. Skiba E.A. et al. Biosynthesis of Bacterial Nanocellulose from Low-Cost Cellulosic Feedstocks: Effect of Microbial Producer //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 18. – С. 14401. <https://doi.org/10.3390/ijms241814401>.
7. Walling B. et al. Bacterial nanocellulose: A novel nanostructured bio-adsorbent for green remediation technology //Acta Ecologica Sinica. – 2023. – Т. 43. – №. 6. – С. 946–967. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2023.02.002>.
8. Shavyrkina N.A., et al. Review of Current Prospects for Using Miscanthus-Based Polymers // Polymers. 2023. Vol. 15. No. 14. 3097 p. <https://doi.org/10.3390/polym15143097>
9. Taokaew S. Bacterial Nanocellulose Produced by Cost-Effective and Sustainable Methods and Its Applications: A Review // Fermentation. – 2024. – Vol. 10. – №. 6. – С. 316. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation10060316>.
10. Гисматулина Ю.А. Разработка рациональных условий азотнокислого способа получения целлюлозы из мискантуса // Фундаментальные исследования. – 2017. – №. 10–2. – С. 189–193.
11. Зенкова А.А., и др. Обоснование выбора концентрации ацетатного буфера при ферментативном гидролизе шелухи овса для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности. – 2022. – С. 297–300. <https://doi.org/10.25699/tohbipp.2022.60.85.032>.
12. Сакович Г.В. и др. Мискантус – сырье для производства бактериальной наноцеллюлозы // Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах. – 2020. – Т. 495. – №. 1. – С. 42–45. <https://doi.org/10.31857/S2686953520060138>.
13. Ovchinnikova E.V. et al. Bioprocessing of oat hulls to ethylene: Impact of dilute HNO₃-or NaOH-pretreatment on process efficiency and sustainability //ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2021. Vol. 9. №. 49. С. 16588–16596.
14. Козозубова Г.М., Зотова-Спановская Н.П. Диагностические признаки древесины и целлюлозных волокон: атлас // Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. – 1986. с. 148.
15. Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Cellulose Nitrates-Blended Composites from Bacterial and Plant-Based Celluloses // Polymers. – 2024. – Т. 16. – №. 9. – С. 1183 <https://doi.org/10.3390/polym16091183>.

**БИОТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ:
ТИРЕОГЛОБУЛИНА, ТИРЕОПЕРОКСИДАЗЫ И РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО
ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА****А.В. Зубков, Л.Г. Бутова, А.А. Корноухова, М.В. Потоцкая, Н.С. Кузьмина, О.А. Свитич***ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия*

Введение. В развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (ЩЖ) ключевыми антигенами, к которым происходит образование антител, являются тиреоглобулин (ТГ), тиреопероксидаза (ТПО), рецептор тиреотропного гормона (рТТГ) [1–4]. Тиреопероксидаза выполняет роль основного фермента в синтезе гормонов щитовидной железы. При постановке диагноза аутоиммунного заболевания у пациентов берут образцы сыворотки крови, в которой клиническими лабораторными методами анализа определяют аутоантитела к ТПО, рецептору тиреотропного гормона, тиреоглобулину [2]. В настоящее время ведутся исследования, направленные на изучение эпитопной структуры аутоантигенов щитовидной железы и проводится эпитопной специфичности аутоантител формирующихся у пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы [1, 3]. Самым крупным по молекулярной массе аутоантигеном щитовидной железы, играющим основную роль на первом этапе формирования аутоиммунного заболевания ЩЖ, является тиреоглобулин, гликопротеин с молекулярной массой 667 кДа, состоящий из двух субъединиц [8, 9]. В разработке тест-систем, ранее применяли человеческий тиреоглобулин, выделенный из щитовидной железы, но полученные образцы ТГ трудно стандартизовать по антигенным свойствам, что может искажать результат анализа [6,7]. Существуют дополнительные сложности в использовании рекомбинантного тиреоглобулина в применении для конструирования диагностических тест-систем, вызванные очень большим размером молекулы тиреоглобулина, посттрансляционными модификациями, гликозилированием и формированием правильного фолдинга, при образовании дисульфидных связей между отдельными участками молекулы, приводит к большим трудностям при получении рекомбинантный ТГ в прокариотических системах экспрессии [10, 11]. Аналогичные проблемы возникают при экспрессии других основных аутоантигенов щитовидной железы: рецептора тиреотропного гормона и тиреопероксидазы человека. Данная работа посвящена одной из ключевых стадий биотехнологического получения рекомбинантных белков – создании векторов для экспрессии наиболее значимых участков генов ТГ, ТПО и рТТГ, кодирующих иммунологически значимые антигенные детерминанты, распознаваемые аутоантителами пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы.

Ключевые слова: тиреоглобулин, тиреопероксидаза, рецептор тиреотропного гормона, рекомбинантные белки, моноклональные антитела, векторы, клеточные линии.

Цель работы – клонирование фрагментов генов тиреоглобулина, тиреопероксидазы и рецептора тиреотропного гормона человека, создание и анализ генно-инженерных конструкций, содержащих различные участки генов ТГ, рТТГ и ТПО для дальнейшей экспрессии в эукариотических клеточных системах, позволяющих получать гликозилированные белки, содержащие иммунологически значимые антигенные детерминанты основных аутоантигенов щитовидной железы, что позволит усовершенствовать существующие диагностические тест-системы для определения аутоантител и аутоантигенов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы.

Основные задачи: выделение РНК из материала ЩЖ пациентов с АИЗ ЩЖ и синтез двухцепочной кДНК методом ОТ-ПЦР на матрице мРНК; получение фрагментов экспрессирующей последовательности генов ТПО, ТГ, рТТГ методом ПЦР; создание генно-инженерных конструкций, содержащих участки экспрессирующихся последовательностей генов ТПО, ТГ, рТТГ, клонирование векторов в *E. coli*, штамм XL1-Blue; анализ полученных генно-инженерных конструкций.

Материалы и методы: Объект исследования: ткань ЩЖ, выделенная от пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы. Выделение мРНК: ткань ЩЖ замораживали в жидком азоте и гомогенизировали. Нуклеиновые кислоты очищали от белков и разделяли методом ультрацентрифугирования при 100 000 g в градиенте цезия хлорида. Для получения кДНК использовали ферментативный синтез двухцепочечной кДНК на poly (A) + – мРНК.

Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli*, штамм XL1 Blue («Евроген, Россия»).

Олигонуклеотиды были подобраны на основе последовательностей, депонированных в Gen Bank, с использованием онлайн-программы Primer Blast. Были синтезированы пять пар праймеров на различные участки, соответствующие кДНК гена ТГ, ТПО и рТТГ. Олигонуклеотиды для амплификации участков кДНК генов ТГ, ТПО и рТТГ были синтезированы в компании «СИНТОЛ» (Россия). Дизайн олигонуклеотидов проводили в программе Blast NCBI. Методом ПЦР для последующего клонирования в векторные системы проведена амплификация фрагментов ДНК различной длины, содержащих участки нуклеотидной последовательности кДНК генов ТПО, ТГ, рТТГ с помощью ПЦР – амплификатора T-100 (Bio-Rad). Полученные ПЦР-продукты и пробы ДНК (на этапах клонирования) разделяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле; ПЦР – продукты выделяли из геля агарозы с помощью набора реактивов Cleanup Standart по методике производителя.

Реакцию лигирования проводили с помощью набора Quick-TA kit без предварительной обработки рестриктазами в соответствии с инструкцией к набору. Для клонирования полученных ПЦР – продуктов и контроля экспрессии были использованы векторы: pAL2-T, pVAX1.

Результаты и обсуждение. Выделение тотальной РНК проводили согласно методике, описанной в разделе материалы и методы. Полученные образцы РНК разделили методом электрофореза в 1,5 % в геле агарозы при напряжении 75 В. Полученная электрофореграмма представлена на рисунке 1.

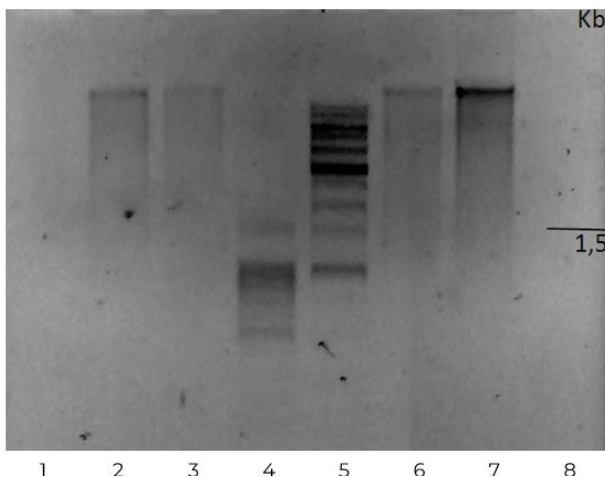


Рисунок 1. Электрофореграмма проб РНК в 1,5 % агарозном геле (образцы № 1–4). Дорожки 1,8 – пустые; дорожка 2 – образец № 1; дорожка 3 – образец № 2; дорожка 4 – маркер длин ДНК 100 bp DNA Ladder; дорожка 5 – маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder; дорожка 6 – образец № 3; дорожка 7 – образец № 4

Из 4 образцов ткани щитовидной железы было получено 4 образца РНК. На матрице, выделенной poly (A) – мРНК, синтезировали 4 образца двухцепочечной ДНК. Для дальнейшей амплификации фрагментов кДНК генов ТПО, ТГ и рТТГ использовали образец № 1, № 2, № 3, № 4.

Для создания генно-инженерной конструкции, содержащей участок кДНК экспрессирующей последовательности гена ТПО использовали фрагмент длиной 634 п.н.

На рисунке 2 показана нуклеотидная последовательность фрагмента кДНК 634 п.н. ТПО после секвенирования.

ПЦР в градиенте температур и электрофорез в 1,5 % агарозном геле проводили в соответствии с методиками, описанными в материалах и методах. В качестве матриц использовали разведённые в 100 раз кДНК-матрицы № 1 и № 4. Объём смеси, приходящийся на одну реакцию, составлял 12,5 мкл.

Электрофореграмма ПЦР – продуктов, полученная в ходе эксперимента, представлена на рис. 3.

В результате из 6 ПЦР продуктов было получено 2 образца. Для дальнейшей процедуры клонирования экспрессирующихся фрагментов гена ТПО длиной 634 п.н. использовали образец № 1, № 2. ПЦР и электрофорез в 1,5 % агарозном геле проводили в соответствии со стандартной методикой. В качестве матриц использовали разведённые в 100 раз кДНК ТПО № 1, № 2, № 3. Объём смеси, приходящийся на одну реакцию, составлял 25 мкл.

Из геля вырезали продукты амплификации длиной ~634 п.н (рис. 3, образец № 1 на дорожке 1), 634 п.н. (рис. 3., образец № 2 на дорожке 3). Выделение продуктов амплификации из геля проводили с помощью набора Cleanup Standard («Евроген») по инструкции производителя. Выделенные и очищенные из агарозного геля продукты амплификации использовали для лигирования в вектор pAL2-T. Было приготовлено 2 реакционные смеси, которые содержали ампликоны 634 № 1, 634 № 2 полученные в ходе ПЦР с образцом кДНК № 1.

ТПО 634_Frw →
 CCAGGTTACAATGAGTGGAGGGAGTTCTGCGGCCTGCCTCGCCTGGAGACCCCGCTGA
 CCTGAGCACAGCCATCGCCAGCAGGAGCGTGGCCGACAAGATCCTGGACTTGTACAAG
 CATCCTGACAACATCGATGTCTGGCTGGGAGGCTTAGCTGAAACTTCCTCCCAAGGGCT
 CGGACAGGGCCCTGTTTGCCTGTCTATTGGGAAGCAGATGAAGGCTCTGCGGGACG
 GTGACTGGTTTTGGTGGGAGAACAGCCACGTCTTACGGATGCACAGAGGCGTGAGCT
 GGAGAAGCACTCCCTGTCTCGGGTCATCTGTGACAACACTGGCCTCACCAGGGTGCCCA
 TGGATGCCTTCCAAGTCGGCAAATTCCTCCGAAGACTTTGAGTCTTGTGACAGCATCACTG
 GCATGAACCTGGAGGCTGGAGGGAAACCTTCTCAAGACGACAAGTGTGGCTTCCCA
 GAGAGCGTGGAGAATGGGGACTTTGTGCACTGTGAGGAGTCTGGGAGGCGCGTGCTG
 GTGTATTCTGCCGGCACGGGTATGAGCTCCAAGGCCGGGAGCAGCTCACTTGCACCCA
 GGAAGGATGGGATTTCCAGCCTCCCTCTGCAAAGACTCCGGGAGG
 ← ТПО 634_Rev

Рисунок 2 – Нуклеотидная последовательность фрагмента кДНК по результатам секвенирования

В результате трансформации клеток *E. coli* (штамм XL1-Blue) лигазными смесями, и бело-голубой селекции, отобрали 10 колоний бактерий, которые перенесли в стерильную среду LB с ампициллином. После инкубации при 37°C в течение ночи бактериальный рост наблюдался в 8 из 8 пробирок.

В табл. 4. представлена характеристика образцов плазмид, выделенных из ночной культуры клеток *E. coli* с помощью набора Plasmid Miniprep («Евроген») по инструкции производителя.

Электрофореграмма рекомбинантных плазмид показана на рис. 4.

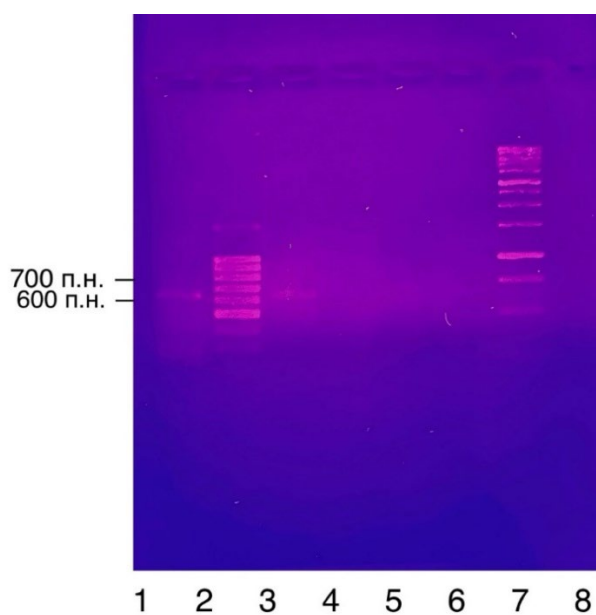


Рисунок 3 – Электрофореграмма ПЦР продуктов в 1,5 % агарозном геле: Дорожка 1 – ПЦР продукт № 1 (матрица 1); дорожка 2 – маркер 100 bp DNA Ladder; дорожка 3 – ПЦР продукт № 2 (матрица 1); дорожка 4 – ПЦР продукт № 3 (матрица 2); дорожка 5 ПЦР продукт № 4 (матрица 2); дорожка 6 ПЦР продукт № 5 (матрица 3); дорожка 7 – маркер 1 kb DNA Ladder; дорожка 8 – ПЦР продукт № 6 (матрица 3)

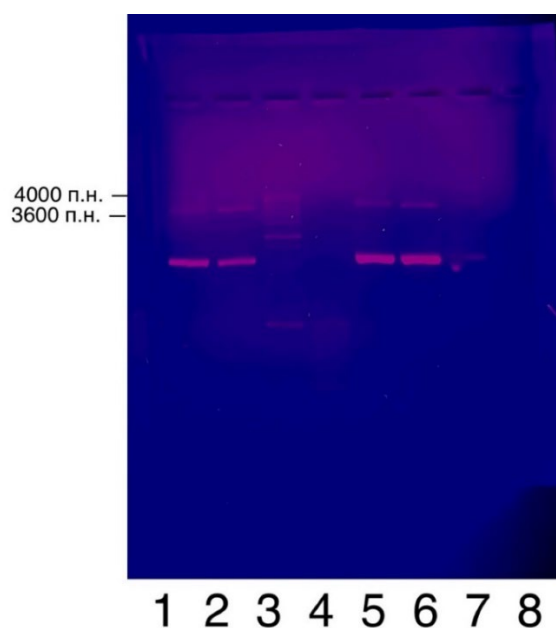


Рисунок 4 – электрофореграмма плазмидных ДНК. Дорожка 1 – образец № 5, дорожка 2 – образец № 4, дорожка 3 – маркер 1 kb DNA Ladder, дорожка 4 – маркер 100 bp DNA Ladder, дорожка 5 – образец № 3, дорожка 6 – образец № 2, дорожка 7 – образец № 1, дорожка 8 – пустая

В результате работы были получены 8 клонов продуцентов *E. coli* штамм XL1-Blue, содержащих генно-инженерные конструкции с фрагментом экспрессирующей апоследовательности гена ТПО человека. Полученные конструкции были реклонированы в вектор pVAX1 для дальнейшей экспрессии участка экспрессирующей последовательности гена ТПО в эукариотических клеточной линии СНО.

Получение генно-инженерных конструкций с фрагментами гена ТГ. На матрице мРНК гена ТГ были синтезированы 5 пар олигонуклеотидов, фланкирующих участки экспрессирующей последовательности: первый участок размером 588 п.н. (7381–7968 п.н.); второй участок размером 770 п.н. (7244–8013 п.н.); третий участок размером 864 п.н. (2297–3160 п.н.); четвертый участок размером 902 п.н. (4629–5530 п.н.); пятый участок размером 833 п.н. (5529–6361 п.н.). В качестве матричной последовательности использовали последовательность мРНК ТГ NM_003235.5, опубликованную в базе данных GeneBank. Все 5 участков последовательности гена ТГ были клонированы в вектор pVAX1.

Были сконструированы генно-инженерные конструкции, содержащие участки экспрессирующей последовательности генов ТГ, ТПО и рТГ, готовые к экспрессии в эукариотической клеточной линии СНО.

Литература

1. Зубков А.В. и др. Получение рекомбинантных белков рецептора тиреотропного гормона и тиреопероксидазы человека // Актуальная биотехнология. – 2020. – №. 3. – С. 559–561.
2. Трошина Е.А., Панфилова Е.А., Михина М.С., Свиридонова М.А. Тиреоидиты. Методические рекомендации (в помощь практическому врачу). ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России, Москва, 2019 г.
3. Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C., et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer // Thyroid. – 2016. – Vol. 26. – № 1. – P. 1–133.
4. Зубков А.В. и др. КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ КДНК ГЕНА ТИРЕОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА // Актуальная биотехнология. – 2023. – №. 4. – С. 21–25.
5. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России – 2021. – илл. – 252 с.
6. Godlewska M. et al. Thyroid peroxidase (TPO) expressed in thyroid and breast tissues shows similar antigenic properties // PLoS one. – 2017. – Т. 12. – №. 6. – С. e0179066.
7. Srivastava V.K., Singh H. // Association of thyroid peroxidase antibody and dyslipidemia in subclinical hypothyroidism, 2017, Journal of Family Medicine and Primary Care. 6(1) : p. 63–68, DOI: 10.4103/2249–4863.214958
8. Вдовенко М.М., Зубков А.В., Кузнецова Г.И., Сахаров И.Ю., Кузьмина Н.С., определение тиреоглобулина в иммуноферментном анализе с системой усиленной хемилюминесценции при использовании пероксидазы сои
9. Giovanella, L., Feldt-Rasmussen, U., Verburg F.A., Grebe S.K., Plebani M. and Clark P.M. Thyroglobulin measurement by highly sensitive assays: focus on laboratory challenges // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). – 2015. – Vol. 53. – № 9. – P. 1301–1314
10. Netzel B.C., Grebe S.K., Carranza Leon BG, et al. Thyroglobulin (Tg) Testing Revisited: Tg Assays, TgAb Assays, and Correlation of Results With Clinical Outcomes // J Clin Endocrinol Metab. – 2015. – Vol. 100. – № 8. – P. E1074–E1083.
11. Powell R. et al. Recombinant expression of homodimeric 660 kDa human thyroglobulin in soybean seeds: An alternative source of human thyroglobulin // Plant Cell Rep. – 2011. – Vol. 30. – № 7. – P. 1327–1338.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ГРИБНЫХ ПРОТЕАЗ ПРИ ОБРАБОТКЕ ОЛЕНЬИХ ШКУР**Е.И. Курбатова¹, А.С. Серeda¹, Е.В. Костылева¹, К.В. Вьюгин², Е.А. Михайловский³**¹ ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, Россия

МГУТУ им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия

³ НОЦ «Российская Арктика», г. Архангельск, Россия

Ферментативные гидролизаты коллагенсодержащих вторичных ресурсов животноводческой отрасли имеют большой потенциал в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. Так шкуры северных оленей, непригодные для применения в меховом и кожевенном производстве из-за наличия дефектов, являются перспективным источником коллагена для получения гидролизатов, обладающих функциональными и биологически активными свойствами. В связи с уходом с российского рынка основных производителей ферментных препаратов (ФП) важным аспектом также является разработка новых отечественных ФП протеолитического действия, эффективных при переработке белоксодержащего сырья.

Нативный коллаген имеет жесткую фибриллярную структуру, устойчивую к действию большинства протеолитических ферментов. Однако некоторые сериновые и металлопротеазы обладают коллагеназной активностью. Используя метод Мандла, мы определили, что коллагеназная активность наиболее известных зарубежных ФП протеолитического действия – Alcalase, Flavourzyme (Novozymes A/S, Дания) и лабораторного образца нового отечественного препарата Протооризин LAP, составляет 1184 ± 71 , 651 ± 47 и 954 ± 53 ед./г соответственно. Для проведения гидролиза обезвоженную шкуру северного оленя разрезали на квадратные куски весом 0,5 г. Гидролиз проводили в течение 24 ч при 40 °С в 0,05 М фосфатном буфере pH 7,0 при гидромодуле 1:6. Препараты дозировали из расчета 5 ед. коллагеназной активности/г субстрата. По окончании гидролиза ферменты инактивировали инкубированием при 95 °С в течение 15 мин, нерастворившийся субстрат отделяли центрифугированием, в супернатанте определяли содержание растворимого белка спектрофотометрическим методом. Помимо длительного гидролиза, был проведен кратковременный процесс (в течение 4 ч) с предварительной термообработкой погруженного в буфер субстрата – в течение 30 мин при 95 °С.

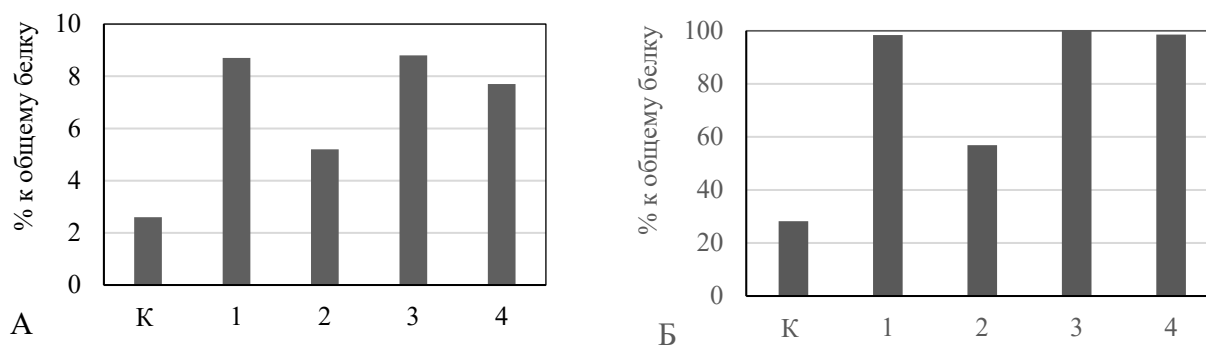


Рисунок 1. Содержание растворимого белка в гидролизатах шкур северного оленя, полученных с использованием различных ФП: К – без ФП, 1 – Alcalase, 2 – Flavourzyme, 3 – Alcalase + Flavourzyme, 4 – Протооризин LAP. А – 24 ч гидролиза без предобработки, Б – 4 ч гидролиза с термopредобработкой

Из полученных результатов (рис. 1) очевидно, что коллагеназная активность исследуемых препаратов недостаточно высока для эффективной обработки шкур. После 24 ч гидролиза в растворимое состояние перешло менее 10 % от содержания общего белка в образцах, определенного методом Кьельдаля.

Термopредобработка значительно повысила эффективность действия протеаз, благодаря желатинизации коллагена. Выход растворимого белка в вариантах с ФП Alcalase, Протооризин LAP, а также при совместном действии Alcalase и Flavourzyme достигал 98–100 %, что обусловлено доступностью желатинизированного коллагена для действия протеаз. Обработка ФП Flavourzyme обеспечила переход в растворимое состояние лишь 56,9 % белка.

Электрофоретический анализ белковых гидролизатов, полученных с термопредобработкой, подтвердил высокую эффективность препаратов Alcalase и Протооризин LAP при получении гидролизатов коллагена оленьих шкур, которые обеспечили переход всех белков коллагена в пептиды с молекулярной массой ниже 10 кДа (рис. 2). В варианте с индивидуальным использованием ФП Flavourzyme наблюдаются промежуточные продукты гидролиза с молекулярной массой от 10 до 50 кДа.

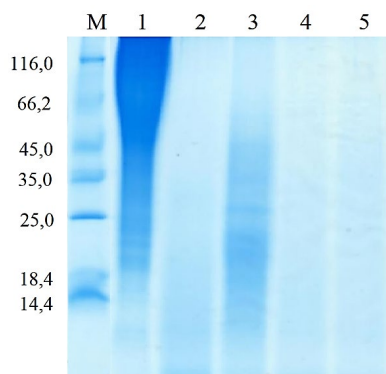


Рисунок 2. Электрофореграмма гидролизатов термопредобработанной шкуры оленя после обработки ФП, где: М – маркер, 1 – контроль без ФП, 2 – Alcalase, 3 – Flavourzyme, 4 – Alcalase + Flavourzyme, 5 – Протооризин LAP

Таким образом, лабораторный образец протеолитического ФП Протооризин LAP показал высокую эффективность при гидролизе желатинизированного коллагена шкур северного оленя, успешно заменив наиболее широко применяемые в пищевой промышленности зарубежные препараты. Полученные результаты показывают перспективность разработки технологии переработки вторичного сырья оленеводства с использованием отечественного ферментного препарата протеолитического действия.

Исследования выполнены в рамках государственного задания № FGMP-2022-0006

УДК 637.1

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-3-27>

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ МУТАНАЗЫ, РАСЩЕПЛЯЮЩЕЙ α -1,3-D-ГЛЮКАН И РАЗРУШАЮЩЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЁНКИ, ИЗ *TRICHODERMA HARZIANUM*, ЭКСПРЕССИРОВАННОЙ В *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

О.А. Сеницына¹, П.В. Волков², И.Н. Зоров^{1,2}, А.М. Рожкова², Б.С. Комарова³, Н.С. Новикова³, Н.Е. Нифантьев³, А.П. Сеницын^{1,2}

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

³ ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН

Ген *mutAW*, кодирующий мутаназу А гриба *Trichoderma harzianum* (MutA, семейство GH71, α -1,3-глюканаза, ЕС 3.2.1.59), был клонирован и гетерологично экспрессирован высокопродуктивным грибом *Penicillium verruculosum*. Для штамма *P. verruculosum* MutA были получены неочищенные ферментные препараты с содержанием рекомбинантной Мута 40 % от общего секретируемого белка. Мута, выделенная в гомогенном состоянии, имела молекулярную массу 67 кДа и проявляла максимальную активность по отношению к мутану (α -1,3-глюкану) при pH 5,0 и 50 °C. При температуре 40–50 °C Мута была стабильна в течение по меньшей мере 3 ч. K_m и k_{cat} составляли 1,0 г/л и 30 с⁻¹, соответственно, при использовании мутана в качестве субстрата. Глюкоза была основным продуктом длительного гидролиза мутана. ВЭЖХ-анализ продуктов гидролиза олиго- α -(1/3)-D-глюкозидов, содержащих в качестве агликона определяемый УФ-излучением остаток N-транс-циннамоила, показал, что Мута характеризуется эндопроцессивным гидролитическим действием. Было продемонстрировано, что Мута разрушает бактериальные биоплёнки как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий за счёт разрушения входящих в состав их полисахаридной матрицы мутана.

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЛЕПЕСТКАХ БАРХАТЦЕВ РАЗЛИЧНОГО ВИДА И ЦВЕТОВОГО ОКРАСА

С.И. Лоскутов¹, Я.В. Пухальский¹, Н.И. Воробьев²¹ Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина, Санкт-Петербург, Россия² Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Соцветия бархатцев (*Tagetes sp.*) наравне с фруктами и овощами считаются богатым источником жирных кислот (ЖК) – класса липидов, проявляющих сигнальные свойства. Они составляют основу клеточных мембран, обеспечивают метаболическую энергию, влияют на функции мембраносвязанных ферментов / рецепторов, проводят сигнальные каскады. Структурно ЖК делят на насыщенные (НЖК) и ненасыщенные (ННЖК). Наиболее полезными для организма являются ННЖК – линоленовая (C18:3), линолевая (C18:2), олеиновая кислоты (C18:1), которые не синтезируются в организме человека и поступают только с пищей. У разных видов и сортов декоративных растений, так же как и у сельскохозяйственных, соотношение ННЖК/ННЖ может варьировать и находится под строгим генетическим контролем.

Методами нейросетевого анализа биохимических профилей содержания ЖК возможно проводить оценку качество получаемого сырья для косметического и лекарственного производства. Публикаций, представляющих результаты исследования профилей жирных кислот в соцветиях цветов эфиромасличных растений в научной литературе практически нет [1–2].

Цель работы – изучение качественного состава и особенностей распределения жирных кислот в соцветиях двух видов Бархатцев, соответствующих стандартным эфиромасличным и лекарственным культур.

Методика исследований. Для эксперимента были выбраны два вида бархатцев: прямостоячие (*T. erecta L.*) и отклоненные (*T. patula L.*), также различающиеся цветом соцветий: желтые и оранжевые. Эксперимент проводили в закрытой оранжерее НОЦ «Зимний сад» (ЛГУ им. А.С. Пушкина, г. Санкт-Петербург). Температура в помещении составляла 25–28 °С при влажности воздуха 60–70 %. Растения выращивали до фазы полного цветения при искусственном освещении (полной светокультуре) в пластиковых кассетах. В каждой кассете ячейки были заполнены нейтрализованным верховым торфом, куда высаживали по десять растений. Технология выращивания не предусматривала внесения пестицидов и удобрений. По окончании экспозиции бутоны срезали, взвешивали и оставляли на хранение при температуре -80 °С. Содержание жирных кислот определяли по методике ГОСТ [6] на газовом хромато-масс-спектрометре Agilent 7890 (Agilent Technologies Canada, Inc.), оснащенный пламенно-ионизационным детектором, автоинжектором и капиллярной колонкой SP-2560 с внутренним диаметром 100 м×0,25 мм и толщиной пленки 0,20 мкм (Merck KGaA, Germany). Полученные данные профиля жирных кислот бархатцев анализировали с помощью авторской вычислительной нейронной сетью ChemNN, которая была создана в Excel-среде (язык VBA) [3–4]. Она преобразует исходные данные профилей содержания жирных кислот в индексы когнитивной значимости цифровых данных профилей жирных кислот – CSIfract = 0–10 б/п (Cognitive Salience Index) [5].

Результаты и обсуждения. В результате эксперимента были идентифицированы десять жирных кислот из цветочных лепестков бархатцев *T. erecta* и *T. patula* и определено их относительное содержание в растениях (Рис. 1).

Нами экспериментально установлено, что преобладающими компонентами в лепестках обоих видов оказались пальмитиновая (24,3–40,6 %), линолевая (13,8–26,9) и стеариновая (19,3–21,9 %) кислоты. Наибольшее количество пальмитиновой кислоты отмечено в оранжевых лепестках *T. erecta* – 40,6 %; линолевой в желтых лепестках *T. erecta* – 26,9 %. Наибольшее содержание стеариновой кислоты также детектировано в оранжевых лепестках – *T. erecta* – 21,9 %. Данные группы кислот играют важную роль в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний и инсулинорезистентности, а также имеют гастропротективные свойства. Нами установлено, что доля олеиновой кислоты составляла лишь 1,8–3,6 %. Наибольшее ее содержание отмечено в желтых лепестках *T. patula* – 3,6 %. Наименьшая концентрация у обоих видов бархатцев отмечена для пальмитолеиновой кислоты (C16: 1) – 0,1–0,5 %; наибольшее ее содержание было в оранжевых лепестках *T. patula* – 0,5 %.

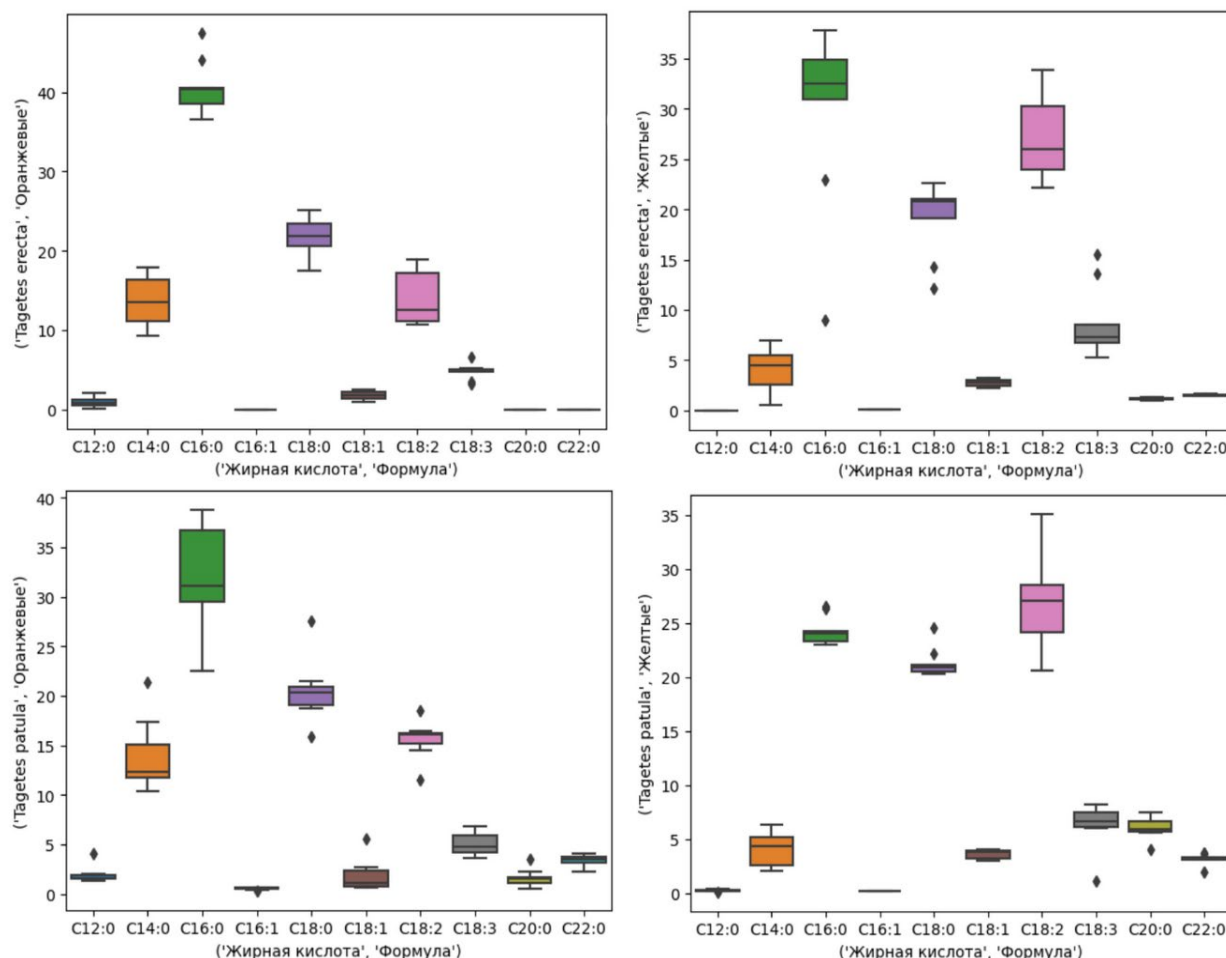


Рис. 1. Содержание жирных кислот в лепестках бархатцев различного вида и окраса, %.

Содержание прочих жирных кислот в разных растениях варьировало, в частности – миристиновая кислота в максимальной концентрации зафиксирована у оранжевых видов *T. patula* и *T. erecta*, а α -линоленовой кислотой наиболее богаты желтые лепестки видов *T. patula* и *T. erecta*. В целом все проанализированные образцы характеризовались высоким процентом синтеза ненасыщенных жирных кислот ННЖК (55,8–77,1 %) и низким процентом выхода насыщенных НЖК (20,5–38,5 %), полезных для здоровья человека. Индекс соотношения ННЖК/ННЖ (Табл. 1) показал, что оранжевые формы обоих видов синтезируют большее количество ННЖК. Однако, сопоставив показатели полученных индексов CSIfract1 и CSIfract2, делается заключение о перспективности выращивания желтоцветковых сортов вида *T. erecta* для пищевой и лекарственной промышленности.

Таблица 1. Оценка урожайности соцветий и индексы фрактальной композиции жирных кислот бархатцев разных видов и окрасов, характеризующих интенсивность накопительных биохимических процессов в растениях (CSIfract1) и близость профиля жирных кислот к эталонному профилю кислот (CSIfract2)

Показатель	SE	Вид				Эталонный профиль состава жирных кислот
		Tagetes erecta		Tagetes patula		
		Оранжевые	Желтые	Оранжевые	Желтые	
		1	2	3	4	
Биомасса, г/растение	±5	30,98	36,86	31,22	29,93	–
Индекс CSIfract1	±0,1	2,7	7,6	6,2	2,7	5,6
Индекс CSIfract2	±0,1	4,4	3,7	4,9	4,8	0,0
ННЖК/ННЖ	±0.1	3.8	1.5	3.2	1.6	3.8

Литература

1. Fernandes L., Ramalhosa E., Pereira J.A., Saraiva J.A., Casal S. The Unexplored Potential of Edible Flowers Lipids // Agriculture. 2018. Vol. 8(10). 146. doi: 10.3390/agriculture8100146
2. Kokten K., Mokhtarzadeh S., Çağan E., Kutlu A.M., Ozdemir S., Ucar R., Ekmekci M. Fatty acid composition of stems, leaves, flowers, and seeds of some medicinal plants // Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse. 2023. 100(2). P. 103–108.
3. Гафаров Ф.М., и др. Искусственные нейронные сети и их приложения. Казань: Изд-во Казан. ун-та. 2018. 121 с.
4. Круглов В.В., Борисов В.В. Искусственные нейронные сети. Теория и практика. М.: Горячая линия Телком. 2002. 382 с.
5. Sutrop U. List Task and a Cognitive Salience Index // Field method. 2001. Vol. 13(3). P. 263–276.
6. ГОСТ 30418-96. Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава.

УДК 579.66

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-3-30>СПОСОБНОСТЬ *GORDONIA AMICALIS* G2 ПРОДУЦИРОВАТЬ БИОСУРФАКТАНТЫ ГЛИКОЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ

И.А. Нечаева, А.С. Филиппова, А.Н. Осина

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Биотехнологический интерес к представителям рода *Gordonia* обусловлен разнообразными ферментативными реакциями, катализируемыми этими бактериями. Большинство видов гордоний были выделены благодаря их способности разлагать ксенобиотики, а также трансформировать или синтезировать полезные соединения. К таким соединениям относятся L-лизин и некоторые его аналоги, полисахарид гордонан, биосурфактанты и биоэмульгаторы, каротиноиды и имидазолы. В будущем в штаммах гордонии могут быть обнаружены и другие высокоактивные вещества, которые будут представлять большой интерес для различных областей промышленности [1].

Для исследования был выбран штамм *Gordonia amicalis* G2, способный к деградации н-алканов. Культивирование проводили при 32°C на минеральной среде Эванса, содержащей н-гексадекан в количестве 2 % от объема в качестве единственного источника углерода и энергии. Как известно, биосурфактанты являются вторичными метаболитами бактерий и образуются в стационарной фазе роста. Для определения времени наступления стационара при культивировании штамма *Gordonia amicalis* G2 измеряли оптическую плотность культуры через определённые промежутки времени.

Для доказательства образования биосурфактантов проводили измерение поверхностного натяжения на тензиометре «KRUSS» в бесклеточном супернатанте при температуре 25 °C. Снижение поверхностного натяжения с 58 до 39 мН/м свидетельствует о присутствии биосурфактантов в бесклеточном супернатанте. Исходя из кривой роста и зависимости значений поверхностного натяжения культуральной жидкости от времени (рис. 1) следует, что оптимальное время культивирования для образования биосурфактантов данным штаммом составляет 100 часов.

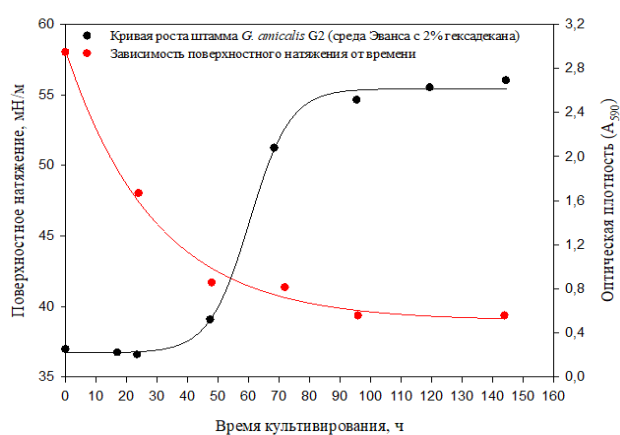


Рис. 1. Кривая роста бактерий *Gordonia amicalis*G2 и зависимость поверхностного натяжения от времени

Выделение биосурфактантов проводили жидкостной экстракцией с помощью метил-трет-бутилового эфира. Для качественной оценки полученного экстракта биосурфактантов, использовали тонкослойную хроматографию. На хроматограмме наблюдали проявление окрашенных сине-фиолетовых и желтых пятен, что свидетельствует о наличии углеводов и липидных компонентов в выделенном экстракте, соответственно. Таким образом, штамм *Gordonia amicalis* G2 при использовании в качестве источника углерода н-гексадекана способен продуцировать биосурфактанты гликолипидной природы.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 24-24-20033.

Литература

1. Arenskotter M., Broker D., Steinbuchel A. Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia* // Applied and environmental microbiology. 2004. V. 70 (6). P. 3195–3204.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА НЕКОТОРЫХ ПИЩЕВЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

С.М. Петров^а, С.Л. Филатов^б, М.С. Михайличенко^б, Н.М. Подгорнова^б

^а Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия

^б ООО «НТ-Пром», Москва, Россия

Практическое значение органических кислот велико, поскольку они широко используются в различных отраслях промышленности и рынок сбыта их ежегодно увеличивается. Органические кислоты могут быть получены из ископаемых источников с помощью процессов нефтехимической переработки, но большинство из них являются естественными метаболитами, вырабатываемыми различными клетками живых организмов. Эти молекулы являются продуктами, субпродуктами или сопутствующими продуктами первичных метаболических процессов в микробных клетках. Благодаря развитию промышленной биотехнологии за последние десятилетия производство этих органических кислот из микробных источников значительно выросло. Это стало возможным благодаря совместным усилиям микробиологов-биотехнологов, биохимиков и инженеров-технологов. В последнее время появилась возможность использовать возобновляемые ресурсы, что позволяет применять более устойчивый подход к производству органических кислот. Отходы промышленности в виде биомассы используются в качестве сырья не только для производства биотоплива, но и для производства органических кислот, что еще больше повышает устойчивость этого процесса в рамках кругового подхода к биоэкономике. Так в [1] представлены последние и перспективные разработки в области производства лимонной и молочной органических кислот, обсуждаются текущие проблемы для их успешного производства.

Органические кислоты считаются одними из наиболее важных химических компонентов и заменителей в различной продукции, занимая третье место среди других химических соединений. Доказано, что эти кислоты находят множество применений, в том числе в качестве добавок в производстве пищевых продуктов и в качестве сырья для химической промышленности. Они также используются при производстве силоса. Органические кислоты могут быть получены как химическими, так и микробиологическими методами. Однако ферментация считается наиболее эффективным методом для промышленного производства. Генетически модифицированные штаммы могут давать высокий выход органических кислот из альтернативного сырья, такого как сельскохозяйственные отходы. Выбор сырья и микробиологических источников считается важным фактором повышения производительности и выхода продукции, особенно при крупномасштабном производстве. Твердофазная ферментация (SSF, solid-state fermentation) с использованием возобновляемых источников в качестве сырья является предпочтительной из-за ее экономических преимуществ, связанных с низкой стоимостью и доступностью. Среди различных органических кислот в наибольших количествах производится лимонная кислота – 1,6 млн т в год, в то время как уксусная и молочная кислоты занимают второе и третье места соответственно. Эти кислоты широко используются в пищевой, молочной, фармацевтической и других отраслях промышленности, а также в производстве красок, пластмасс и лаков. Они играют важную роль в качестве хелатообразователей при удалении металлических загрязнителей из почв. Вызывает большой интерес использование побочных продуктов сельского хозяйства в качестве основного сырья для производства различных органических кислот. Эти побочные продукты являются одновременно возобновляемыми и экономически недорогими материалами, которые могут быть легко использованы микроорганизмами при промышленном и крупномасштабном производстве органических кислот [6].

Органические кислоты могут быть получены в результате микробиологического метаболизма либо естественным путем, либо после перенаправления потока углерода к желаемой мишени. Тем не менее, этот процесс предполагает нетривиальные допущения. Биокатализатор должен быть способен преобразовать заданную биомассу в определенный продукт с максимальным титром, выходом и производительностью. При производстве сырья эти параметры должны соответствовать конечной цене продажи, которая составляет приблизительно или, в идеале, ниже 200 руб. за кг. Воплощение этой концепции в промышленном процессе означает, что биокатализатор будет вынужден производить ненатуральный продукт или накапливать натуральный продукт до нефизиологических титров в

неприродной среде, начиная с непредпочтительного субстрата. Как правило, для решения основных проблем, связанных с определением эффективности ферментации, предлагаются специальные клеточные фабрики. В целом, в процессе расширения производства одной из основных проблем является возможность получения штаммов, которые могут поддерживать те же показатели, что и при производстве в лабораторных условиях. В частности, подчеркиваются существенные различия в окружающей среде, характерные для биореакторов коммерческого масштаба, по сравнению с системами культивирования в лабораторных условиях. Колебания и неоднородность химических и физических параметров в больших биореакторах, а также нестабильность генома и дрейф, наблюдаемые при длительном культивировании, являются яркими примерами проблем, которые часто упускаются из виду или которые трудно воспроизвести в лабораторных условиях. Этот разрыв чрезвычайно затрудняет прогнозирование физиолого-биохимических свойств штаммов и, следовательно, оптимальное инженерное проектирование [1].

Несмотря на то, что вышеуказанное наводит на мысль о недостижимости цели, благодаря новым технологическим разработкам все большее число микробиологических процессов удовлетворяет требованиям масштабирования и становится жизнеспособной альтернативой химическому синтезу в промышленных масштабах. Среди множества органических кислот, вырабатываемых микроорганизмами, некоторые играют важную роль в промышленности благодаря их конкурентоспособности по сравнению с традиционными методами производства. С разной степенью успеха на рынке появились микробиологические лимонная, янтарная, молочная, итаконовая, лактобионовая, глюконовая, фумаровая и пропионовая кислоты. С исторической точки зрения, лимонная кислота была первой органической кислотой, произведенной микробными клетками промышленным путем, за ней последовали молочная, фумаровая, янтарная и итаконовая кислоты.

При твердофазной ферментации, также известной как процесс Коджи, используется твердый нерастворимый материал, который действует как субстрат и носитель в среде с низкой активностью воды. Могут использоваться различные конфигурации реакторов, такие как колбы, тарелки, горизонтальные барабаны и стеклянные колонны. Трехфазная ферментация SSF для производства лимонной кислоты (CA, Citric Acid) имеет ряд преимуществ перед глубинной и поверхностной ферментацией, поскольку позволяет использовать агропищевые отходы и неразрывно коррелирует с более низким потреблением энергии и воды. И наоборот, во время SSF трудно полностью контролировать параметры процесса; поэтому его трудно масштабировать и стандартизировать, он требует больше времени на процесс и более высоких общих затрат на восстановление продукта по сравнению с другими способами. По этим причинам способ производства SSF еще далек от промышленного применения.

В настоящее время большая часть лимонной кислоты во всем мире производится методом погружной ферментации (SmF, submerged fermentation) с использованием реакторов с мешалкой или барботажных колонн. Этот процесс применяется в больших масштабах и требует более сложного оборудования и точного контроля. Однако он имеет ряд преимуществ, таких как более высокая производительность, более низкие трудозатраты и снижение риска загрязнения. Ферментация под водой может проводиться в трех различных режимах: периодическом, полунепрерывном и непрерывном. Для производства лимонной кислоты чаще всего используется периодическая система. Лимонную кислоту получают при температуре от 28 до 30 °C с использованием питательной среды, содержащей 100–150 граммов на литр источников углерода, таких как сахароза и глюкоза. Обычно этот процесс занимает 5–14 дней, в зависимости от конкретных условий. Как правило, выход лимонной кислоты из углеводов (полезных источников углерода) колеблется в пределах 50–60 % при использовании конидий в качестве начальной инокуляции в условиях интенсивного роста и 80–90 % при использовании предварительно выращенного мицелия в качестве семенной культуры в условиях ограниченного роста. В процессе глубинной ферментации, а также культивирования во встряхиваемой колбе вязкость культурального бульона со временем увеличивается из-за образования *A. niger* амилозоподобных полисахаридов. Чтобы снизить выработку этих полисахаридов, эффективно добавлять вязкие вещества в среду для культивирования в самом начале и / или снижать физическую нагрузку на мицелий. По сравнению с поверхностной ферментацией, глубинная ферментация требует более сложного оборудования, но, в свою очередь, характеризуется более высокими выходами, меньшим временем ферментации, простотой стандартизации и автоматизации процесса и меньшим риском загрязнения.

Решающим шагом в производстве СА является последующий после ферментации процесс, на который, по оценкам, приходится 30–40 % себестоимости. Необходимо учитывать, что на сложность процесса выделения кислоты может сильно влиять тип ферментации (SSF, SF или SmF) и субстрат ферментации; например, использование агропищевых отходов может потребовать дополнительных шагов для получения продукта высокой чистоты. По окончании ферментации микробную биомассу удаляют фильтрованием, после чего бульон можно подвергать различным обработкам для получения очищенной лимонной кислоты. Классический метод выделения СА, который остается наиболее используемым, основан на осаждении соли трицитрата кальция, вызванном добавлением оксида кальция при 90 °С и pH 7 с последующей обработкой серной кислотой, в результате которой образуются растворимая лимонная кислота и сульфат кальция. Сульфат кальция отфильтровывают, а лимонную кислоту подвергают дальнейшей очистке. Альтернативный метод извлечения СА основан на жидкостно-жидкостной экстракции различными растворителями (такими как алифатические спирты, кетоны и третичные амины). В последнее время предложены другие методы, такие как сверхкритическая CO₂-экстракция, адсорбция на катионных смолах и электродиализ [2].

В работе [4] изучен процесс восстановления лимонной кислоты из ферментированной жидкости методом биполярного мембранного электродиализа (BMED). Две биполярные мембраны и одна катионообменная мембрана были сложены для формирования двухкамерной конфигурации BMED. Исследовано влияние плотности тока, начальной концентрации цитрата натрия и структуры кислотного отсека (АС) и основного отсека (ВС) на производительность процесса BMED. Заполнение смешанных ионообменных смол в ВС может снизить сопротивление отсека и привести к чистому основному раствору для повторного использования. Наибольшее восстановление кислоты 97,1 % было достигнуто с 3,3 % исходного цитрата натрия при плотности тока 40 мА·см⁻². Кроме того, снижение напряжения на АС путем заполнения катионообменных смол ограничило миграцию ионов H⁺ из АС в ВС. Более высокая начальная концентрация цитрата натрия оказывает неблагоприятное влияние на восстановление лимонной кислоты. Процесс в ВС с биполярной мембраной (BPM) показал более низкое потребление энергии и более высокую скорость извлечения лимонной кислоты. BMED представляется перспективной технологией для извлечения лимонной кислоты из ферментированной жидкости.

Проведенный технико-экономический и экологический анализ производства СА, сравнивающий извлечение путем осаждения, ионного обмена и экстракции растворителем, показал, что метод ионного обмена является наиболее экологически чистым, тогда как экстракция растворителем с последующим осаждением является наиболее экономически удобной. Другими факторами, оказавшими большое влияние на конечную себестоимость, были расход электроэнергии, стоимость сырья, ферментера и очистки сточных вод.

Производство молочной кислоты (LA) осуществляется путем химического синтеза или ферментации. Микробная ферментация весьма привлекательна для производства молочной кислоты, поскольку позволяет получать чистые изомеры – правовращающуюся (L(+)) или левовращающуюся D(–) вместо рацемической смеси (DA-LA), причем последняя характерна для химического синтеза. Кроме того, при химическом синтезе используются загрязняющие вещества (например, лактонитрил и высокотоксичный цианистый водород), производство которых также имеет высокую себестоимость. В настоящее время более 90 % молочной кислоты производится в результате процессов брожения. LA в основном используется в качестве мономера биоразлагаемой полимолочной кислоты (PLA) для биоразлагаемых пластиков. PLA сегодня считается одним из наиболее перспективных полимеров для производства биопластиков. PLA находит применение в упаковке, сельском хозяйстве, транспорте, электронной, текстильной и других отраслях промышленности.

При традиционной ферментации LA из полисахаридов как ферментативный гидролиз, так и ферментация происходят в отдельных реакторах. Однако твердофазная экстракция (SSF) – это процесс, при котором осахаривание углеводов и микробная ферментация происходят за один этап. SSF является эффективной стратегией улучшения производства LA, поскольку позволяет избежать ингибирования субстрата и сократить время обработки. В процессе SSF скорость потребления глюкозы является решающим фактором, определяющим продуктивность LA в ферментационном бульоне. Если скорость потребления глюкозы меньше скорости ее продуцирования, то это приводит к накоплению глюкозы в ферментационном бульоне, что нежелательно и приводит к ингибированию субстрата. Кроме того,

накопление глюкозы может снизить потребление микроорганизмами других сахаров, таких как ксилоза. Следовательно, для повышения производительности LA количество потребления глюкозы должно быть больше, чем количество ее продуцирования [3].

Хотя и другие микроорганизмы были идентифицированы как продуценты молочной кислоты, как описано выше. В настоящее время молочнокислые бактерии по-прежнему представляют собой лучшие продуценты в промышленном масштабе. Они производят LA путем гликолиза в анаэробных условиях при температуре в диапазоне 25–45 °C (в зависимости от микроорганизма) и pH от 5,5 до 6,5, хотя они также являются микроаэрофильными или аэротолерантными.

Чтобы оптимизировать производство молочной кислоты, следует учитывать некоторые аспекты, которые могут повлиять на процесс ферментации, включая температуру, концентрацию сахара, влияние питательных веществ, смешанных сахаров и образование побочных продуктов.

Решающую роль играет pH ферментации. Так как предпочтительной формой продукта является недиссоциированная форма молочной кислоты, то это означает, что конечный pH среды должен быть значительно ниже pK LA, что соответствует 3,78. Однако при таком pH у большинства молочнокислых бактерий наблюдается необратимое повреждение их метаболических функций. Поэтому в ферментационный бульон добавляют несколько нейтрализующих агентов для поддержания pH и защиты микробных клеток. К сожалению, использование $\text{Ca}(\text{OH})_2$ или CaCO_3 вызывает образование лактата кальция, который необходимо удалить кислотной обработкой (серная кислота), с образованием сульфата кальция (гипс), отхода, вызывающего серьезные проблемы с утилизацией.

Для успешного производства LA рассматриваются разные модификации технологии. Например, Тиан и др. описали применение мутагенеза, адаптивной эволюции и метаболической инженерии на молочнокислых бактериях. Наряду с LAB были оценены как потенциальные продуценты молочной кислоты другие микроорганизмы. Одними из наиболее интересных являются штаммы бактерий *Bacillus*, способные расти при высоких температурах (до 55 °C), избегая дальнейшей стерилизации питательных сред и допуская эксплуатацию биомасс второго поколения, поскольку они устойчивы к некоторым побочным продуктам, образующимся в результате предварительной обработки.

Производство молочной кислоты также можно улучшить путем совместного культивирования штаммов со схожими характеристиками роста, что позволяет получать гомоферментативные штаммы, которые могут воспользоваться преимуществами гетероферментативных штаммов, которые обычно производят низкие количества молочной кислоты из-за накопления других продуктов. Совместные культуры представляют собой интересную перспективу также для стратегии одновременного осахаривания и ферментации (SSF), а также для использования смешанных сахаров; оба являются типичными условиями, когда сырье рассматривается как субстрат ферментации [5].

Из вышеприведенного следует, что производство органических кислот на основе микробов может, по крайней мере, конкурировать, если не заменить, химическое их производство на основе ископаемого топливного сырья.

Основными ограничениями являются производительность и надежность микробиологической отрасли. Что касается повышения производительности микробиологических заводов, необходимо принять во внимание несколько аспектов, часто взаимосвязанных. Одним из них является сбалансированная поставка необходимого сырья, что позволяет рассчитать теоретический выход и дисбаланс или доступность (микро) питательных веществ, чтобы избежать образования побочных продуктов и/или перерасхода энергии. Другим важным аспектом является оценка образования окисленных продуктов или свободных радикалов как следствие энергетического дисбаланса или условий ферментации.

В заключение можно отметить, что благодаря опыту микробной биотехнологии, накопленному за последние десятилетия, теперь совершенно ясно, что получение подтверждения концепции процесса производства органических кислот больше не является ограничивающим этапом. Основным препятствием на пути разработки прибыльных и конкурентоспособных микробиологических и биологических процессов являются параметры масштабирования, которые очень часто трудно воспроизвести в лабораторных условиях. Последние достижения в области технологий и количественного анализа, а также в области синтетической биологии будут иметь решающее значение для стимулирования исследований, а также передачи микробиологических технологий в производство органических кислот в ближайшее время.

Литература

1. Di Lorenzo R.D. et al. State of the art on the microbial production of industrially relevant organic acids // Catalysts. – 2022. – Т. 12. – №. 2. – С. 234.
2. Sheikh H., Anand G.G., Shivanna G.B. Fermentation: A Potential Strategy for Microbial Metabolite Production. – 2024.
3. Singh S. et al. Fermentation Strategies for Organic Acid Production // Industrial Microbiology and Biotechnology. 2022. С. 379.
4. Sun X., Lu H., Wang J. Recovery of citric acid from fermented liquid by bipolar membrane electrodialysis // Journal of Cleaner Production. – 2017. – Т. 143. – С. 250–256.
5. Tran V.G., Zhao H. Engineering robust microorganisms for organic acid production // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2022. – Т. 49. – №. 2. – С. kuab067.
6. Vishnu D., et al. Recent advances in organic acid production from microbial sources by utilizing agricultural by-products as substrates for industrial applications // Bioprocess Engineering for Bioremediation: Valorization and Management Techniques. – 2020. – С. 67–87.

УДК 66.047

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-3-35>**РАЗРАБОТКА ИНОКУЛЯНТА ДЛЯ СОИ, СОДЕРЖАЩЕГО БАКТЕРИИ РОДА
*BRADYRHIZOBIUM*****Е.А. Бунеева, А.С. Рябова, Д.А. Черенков, А.А. Толкачёва, С.А. Ковалевский***Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия*

Соя – одна из самых распространённых возделываемых сельскохозяйственных культур, содержащих большое количество белка. Для его накопления необходимо обеспечить полноценное азотное питание растений. Несмотря на высокие общие запасы азота в почве, основная его часть содержится в виде соединений, недоступных или малодоступных для питания растений. Поэтому традиционно применяются минеральные удобрения, которые получают химическим синтезом. Однако они являются дорогостоящими, негативно влияют на плодородие почв и окружающую среду в целом. Поэтому в настоящее время ведётся разработка биопрепаратов на основе азотфиксирующих микроорганизмов, так как они усваивают молекулярный азот и переводят его в доступные формы для растений. Перспективными микроорганизмами для создания азотфиксирующих препаратов являются бактерии рода *Bradyrhizobium*, которые являются симбиотическими микроорганизмами сои. В связи с этим целью нашей работы является получение инокулянта, содержащего азотфиксирующие бактерии, для обработки семян сои с целью увеличения количества потребляемого азота.

Для инокулянта были выбраны азотфиксирующие бактерии *Bradyrhizobium japonicum* и *Bradyrhizobium elkanii*. На первом этапе был подобран субстрат для выращивания азотфиксирующих бактерий. Для этого микроорганизмы высевали на три разные среды: не содержащую азот, синтетическую и натуральную. Для выбора наиболее эффективной проводили подсчёт КОЕ: высевали с каждой колбы по два разведения на агаризованную среду и выдерживали в термостате. По результатам подсчёта выросших колоний выбрали среду с оптимальным соотношением углерода и азота, а также необходимым содержанием макро- и микроэлементов. На следующем этапе подбирали время культивирования *Bradyrhizobium japonicum* и *Bradyrhizobium elkanii*. Бактерии засевали глубинно и культивировали в течение определённых промежутков времени. С помощью подсчёта КОЕ построили кривую роста и определили оптимальное время для выращивания бактерий.

На заключительном этапе работы был получен опытный образец инокулянта и проверена эффективность хранения обработанных семян. Был подобран состав экстендера, который повышает жизнеспособность бактерий, а также обеспечивает их прилипание к семенам. Культуральную жидкость и экстендер смешивали, наносили на семена сои и хранили при определённых условиях. Через выбранное количество дней делали смыв с семян и высевали на чашки Петри. По результатам подсчёта колоний сделали вывод, что полученный нами инокулянт на основе азотфиксирующих микроорганизмов сохраняется на семенах в течение длительного времени.

В результате работы был получен инокулянт, содержащий азотфиксирующие бактерии рода *Bradyrhizobium*, предназначенный для обработки семян сои перед посевом. Данный биопрепарат поможет решить проблему с недостаточным азотным питанием растений и увеличить урожайность возделываемой культуры.

Работа выполнена при поддержке Фонда Содействия Инновациям, Договор №5136ГC1/89617от 27.11.2023

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЛАНИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАЗЛИЧНОГО ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ**Прутенская Е.А.^{1,2}, Ущаповский В.И.¹, Волков А.О.¹**¹ Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия² Тверской государственный университет, Тверь, Россия

Меланины – пигменты, которые относят к полифенольным структурам, их химическое строение и свойства зависят от происхождения. Меланины, выделенные из различных природных источников, обладают повышенной биоактивностью и рекомендуются исследователями к использованию в восстановительной медицине в качестве профилактической и лечебной биологической добавки. Специфическое строение молекул меланинов, способствует проявлению свойств, обеспечивающих защиту клеточных систем от факторов канцерогенной и мутагенной природы. В зависимости от способа получения меланиновые вещества могут содержать различные сопутствующие вещества, которые определяют биологическую активность, а также компоновку и размер молекулы меланина. Например, меланины чаги, выделенные из березовой чаги, обладают высокой антиоксидантной активностью, но после удаления липидной фракции антиоксидантная активность уменьшается. Многие ученые утверждают, что это происходит за счет снижения активности парамагнитных центров частиц меланина [1]. Также хорошо изучен хитозан-меланиновый комплекс, полученный из подмора пчел. Этот препарат рекомендуется для лечения витилиго. Хитозан на поверхности кожи образует защитный слой, а меланин стимулирует пигментацию.

В связи с вышесказанным, целью работы было получение меланиновых веществ из природных источников, для различного практического назначения.

В качестве объектов исследования были выбраны фитомеланины, полученные из лужги подсолнечника, конопли и зоомеланины, синтезированные гусеницами огневки. Для выделения меланиновых веществ использовали способность меланинов растворяться в щелочной среде и осаждаться при изменении pH близкой к 2. Затем проводились физико-химические методы анализа для определения сопутствующих веществ, выделенных вместе с меланиновыми веществами. Методом РФЭС был обнаружен азот, что свидетельствует о том, что меланиновые вещества были выделены с примесью белковых веществ. ИК-и УФ-спектроскопия показали наличие белковых веществ во всех выделенных меланинах. При определении антиоксидантной активности выделенных меланиновых веществ, было обнаружено, что самой высокой обладают вещества растительного происхождения.

Для удаления сопутствующих веществ в молекуле меланина можно использовать различные методы: переосаждение, ионообменную хроматографию, обработку органическим растворителем и др. В качестве альтернативы методам очистки нами была выбрана ультразвуковая экстракция. Под действием ультразвука происходит уменьшение размера молекулы полимерных веществ [3]. При этом на размер частиц и выход меланиновых веществ влияло время, температура процесса экстракции. Время воздействия ультразвука имело заметное влияние на выход меланина: с увеличением времени экстракции выход меланина также увеличивался с 3,4 % до 8,8 %. Однако, при воздействии ультразвуком более 6 минут экстракт закипал, поэтому необходимо осуществлять процесс при охлаждении, чтобы не происходили нежелательные реакции. При этом размер меланиновых веществ уменьшался в зависимости от условий ультразвуковой обработки. Однако, полного удаления сопутствующих веществ с помощью данного метода произвести не удалось. Только обработка органическим растворителем позволила получить меланиновые вещества без сопутствующих белковых веществ. Физико-химические свойства полученных меланинов позволяют рекомендовать их в качестве полупроводников и компонентов в электронике. Подобранные условия ультразвуковой экстракции и обработки органическим растворителем позволяют получить меланины с наибольшим выходом и с меньшим содержанием сопутствующих веществ.

Литература

1. Сысоева М.А. Влияние гидрофобной компоненты меланина чаги на его структуру и антиоксидантную активность / Сысоева М.А., Иванова Г.А., Захарова Л.Я. // Вестник Казанского технологического университета. 2010. С. 595–600.

2. Хисматуллина Н.З. и др. Перспективы использования пчелиного хитозан-меланинового комплекса в терапии пациентов с витилиго // Компания «Тенториум», г. Пермь Фитотерапия, БАВ естественного происхождения: М-лы 5-й Межд. научной конференции, 22–23 янв. 2004. – Черноголовка, 2004. – с. 367–370

3. Маневич Д.Б. // Пищевая промышленность. 2022. Т. № 3. С. 43.

ПУЛЛОТРИТИЦИН КАК КАТАЛИЗАТОР ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА

С.С. Перкин, О.С. Корнеева, Г.П. Шуваева, Е.А. Мотина

Воронежский государственный университет инженерных технологий Воронеж, Россия

При производстве хлебопекарных прессованных дрожжей формируется производственный отход, содержащий полисахарид – крахмал. Гидролиз этого углевода является одним из основных способов изменения его свойств с целью получения различных углеродсодержащих продуктов, модифицированных крахмалов, использования на кормовые цели. После соответствующей обработки целевыми ферментами, один из которых – пуллулаза, разветвленный полисахарид может быть преобразован в олигосахариды с линейной структурой, хорошо ферментируемые в процессе дальнейшего осахаривания. Установлено, что пуллулаза играет ключевую роль в полном деразветвлении и гидролизе крахмала, улучшая тем самым качество продукции, повышая производительность и снижая производственные затраты при изготовлении резистентного крахмала, глюкозного сиропа и пива. Использование пуллулазы в процессе осахаривания клейстеризованного и разжиженного α -амилазой крахмала в композиции с осахаривающими ферментами (глюкоамилазой, β -амилазой и др.) позволяет повысить скорость процесса, снизить количество осахаривающих ферментов, увеличить степень гидролиза и, соответственно, выход готовой продукции, а также увеличить концентрацию сухих веществ (СВ) субстрата, что приводит к снижению затрат на выпаривание.

Ранее авторами разработан очищенный фермент пуллулазы на основе продуцента *Rhizopus tritici* t1 со степенью очистки 71,25, изучены его физико-химические свойства. На данном этапе проведен эксперимент по оценке ферментативной восприимчивости крахмала к пуллулазе в нативном и клейстеризованном состоянии. По мнению ряда исследователей, преобразованный энзимами полисахарид может быть использован для получения модифицированных крахмалов и крахмалопродуктов с повышенной резистентностью к действию амилаз желудочно-кишечного тракта человека и животных.

С целью практического использования фермента при гидролизе крахмалсодержащего сырья, было изучено изменение скорости реакции в зависимости от условий ее протекания. Пуллулазу вносили из расчета 2 ед./100 мг субстрата, pH 4,5; температура 60 °C (оптимальные параметры определяли экспериментально). Установлено, что изменение концентрации субстрата в пределах 0,25–4,0 % при температуре 60–62 °C незначительно влияет на скорость ферментативной реакции.

Учитывая, что в составе производственного отхода преобладает крахмал, по сравнению с остаточной биомассой дрожжевых клеток, исследовали действие пуллулазы на крахмал в гетерогенной водной среде при температурных условиях, не превышающих начальную точку клейстеризации. Пуллулазу вносили в количестве от 0 до 20 ед. пул/г СВ крахмала, гидролизуя полисахарид в течение 48 часов с отбором проб через 0, 4, 8, 12, 24, 36 и 48 часов. В полученных фильтрах после разделения проб определяли массовую долю СВ и, соответственно, степень растворения крахмала (СРК, % на СВ). Результаты действия испытуемой пуллулазы на нативный крахмал показали, что в этом состоянии молекулы крахмала проявили относительно невысокую ферментативную восприимчивость к действию пуллулазы. Как показали результаты, незначительно изменилась вязкость, растворимость, йодсвязывающая способность образцов крахмала.

Опыты по влиянию пуллотритицина на клейстеризованный и частично гидролизированный декстринирующим ферментом крахмал показали, что наибольшему действию пуллулазы крахмал подвергнулся в первые 8–12 часов гидролиза, при этом были получены гидролизаты с массовой долей редуцирующих веществ от 12 до 32 % в зависимости от дозировки фермента. Суммарное содержание сухих веществ в гидролизатах варьировалось от 38 до 70 %, что не противоречит результатам исследований, проводимым другими авторами.

Таким образом, можно уверенно утверждать о перспективности и актуальности исследований, проводимых в аспекте поиска новых продуцентов для разработки параметров действия пуллулазы с целью поиска новых технологий ферментативной модификации крахмала.

ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ И ОПЕРАЦИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ И ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КАТАЛАЗ МЕТИЛОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ *METHYLOPHILUS QUAYLEI*

А.Б. Пшеничникова¹, М.А. Климович²

¹ МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

² Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Россия

Пероксид водорода H_2O_2 широко применяется в текстильной, целлюлозно-бумажной, пищевой и фармацевтической промышленности, в химии, медицине, биоэлектронике и других важных областях. В связи с этим возникает задача удалять остаточные количества пероксида водорода, обладающего высокой мутагенной активностью. Для этого все чаще применяют фермент каталазу (КФ 1.11.1.6). Наиболее доступны для этих целей каталазы микроорганизмов, например, грибов. Однако мицелиальные грибы отличаются невысокими скоростями роста и потребностью в углеводных субстратах. Альтернативой грибным продуцентам могут служить метилотрофные бактерии, использующие в качестве единственного источника углерода и энергии метанол. Этот субстрат является доступным, возобновляемым и энергетически выгодным. Ранее нами было показано, что в клетках облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* в условиях стресса повышается активность каталазы [1]. Целью настоящей работы было определение каталазной активности в клеточных экстрактах и в бесклеточной культуральной жидкости (БКЖ) бактерии *Methylophilus quaylei* при различной температуре и концентрации субстрата.

Аэробные метилотрофные бактерии *Methylophilus quaylei* (ВКМ В-2338) культивировали в синтетической среде с 1 % об. метанола при 30° С, pH 7 и затем центрифугировали, получая биомассу и БКЖ. Для получения клеточных экстрактов биомассу разрушали ультразвуком в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0 при 0° С. В клеточном экстракте и БКЖ определяли активность каталазы. Активность каталазы измеряли по скорости разложения пероксида водорода, детектируемого спектрофотометрически при 235 нм. Активность выражали в мкмоль пероксида водорода в 1 мин на 1 мг белка. Термическую инактивацию каталаз характеризовали эффективными константами скорости первого порядка $k_{ин}$, c^{-1} , которые определяли по графикам « $\ln k_{ин}$ – время термической обработки образцов». Операционную стабильность фермента определяли как эффективную константу скорости инактивации каталазы, c^{-1} . Для этого строили линейные анаморфозы кинетических кривых разложения H_2O_2 в координатах « $1/\ln([H_2O_2]_0/[H_2O_2]_t) - 1/t$ », где t – время.

Сравнительное исследование характеристик каталаз в клеточных экстрактах и БКЖ показало, что внутри и вне клеток проявляют активность разные формы фермента. Удельная активность внутриклеточного фермента составила 0,46, а внеклеточного – 2,8 мкМ / мин · мг белка, то есть в 6 раз больше. Эти формы фермента различаются и сродством к субстрату – константа Михаэлиса составила 13,5 мМ для внутриклеточного фермента и 5 мМ – для внеклеточного.

Константы скорости инактивации внутри- и внеклеточных каталаз $k_{ин}$, при 45° С составили $0,27 \times 10^3 c^{-1}$ и $0,006 \times 10^{-3} c^{-1}$, а при 60° С внутриклеточный фермент был не активен, тогда как фермент в БКЖ имел $k_{ин} 0,067 \times 10^{-3} c^{-1}$. Следовательно, внеклеточная каталаза проявила более высокую термическую стабильность. Операционная стабильность при начальной концентрации пероксида водорода 15 мМ для обеих форм каталаз оказалась близкой – $8,4 \times 10^{-3} c^{-1}$ для внутриклеточного фермента и $7,0 \times 10^{-3} c^{-1}$ для внеклеточного.

Таким образом, у метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* были обнаружены две формы каталазы – внутриклеточная и внеклеточная, последняя имеет более высокую каталитическую активность, термостабильность и сродство к субстрату пероксиду водорода.

Литература

1. Нево А.Н.С., Пшеничникова А.Б., Складнев Д.А., Швец В.И. Оксид дейтерия как стрессовый фактор у метилотрофных бактерий *Methylophilus* sp. Микробиология. 2004. Т. 73. № 2. С. 175–179.

МАТЕРИАЛЬНЫЙ БАЛАНС ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ИЗ БИОМАССЫ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО

Е.А. Скиба

Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН, Бийск, Россия

Мискантус занимает лидирующее положение среди целлюлозосодержащего сырья, выращиваемого за один вегетационный период. Основными сферами его применения являются энергетика, строительство, целлюлозно-бумажная промышленность, химическая промышленность, органическое земледелие и промышленная биотехнология [1]. Вопрос использования мискантуса как сырья для промышленной биотехнологии неоднозначен, в литературе есть как примеры успешного применения мискантуса, например, для синтеза биоэтанола [2, 3], так и примеры малоэффективного применения мискантуса, например, для синтеза фумаровой кислоты [4].

В данной работе впервые в РФ *Miscanthus giganteus* рассматривается как сырьё для последующей биотехнологической трансформации в ценные продукты, используется сорт КАМИС отечественной селекции. Мискантус с плантации возрастом 7 лет, Московская обл., д. Марушкино, любезно предоставлен ООО «Мастер Брэнд».

Предобработка сырья была проведена в лабораторных условиях при атмосферном давлении и температуре 90–96 °С авторскими способами в одну или две стадии с получением следующих продуктов химической предварительной обработки: 1) продукт азотнокислой обработки (ПАО) получен обработкой сырья 4 %-ным раствором азотной кислоты в одну стадию; 2) продукт щелочной делигнификации (ПЩД) получен обработкой сырья раствором 4 %-ного гидроксида натрия в одну стадию; 3) техническая целлюлоза, азотнокислый способ (ЦАС) получен в две стадии: путём обработки ПАО 4 %-ным раствором гидроксида натрия; 4) техническая целлюлоза, модифицированный щелочной способ (ЦМЩС) получен в две стадии: путём обработки ПЩД 4 %-ным раствором азотной кислоты.

Все четыре полученных продукта были превращены в раствор сахаров путём ферментативного гидролиза с помощью композиции из ферментных препаратов Целлолюкс-А («Сиббиофарм, Россия») и «Ультрафло Коре» («Novozymes A/S», Дания).

Ферментативные гидролизаты были использованы для получения трех продуктов биотехнологического синтеза: биоэтанола с помощью *Saccharomyces cerevisiae* Y-3136 (ВКПМ), в условиях, описанных в работе [5]. Начальная концентрация субстрата 60 г/л, в течение 24 ч проводился ферментативный гидролиз, далее в течение 72 ч совмещенный ферментативный гидролиз и спиртовое брожение; бактериальной наноцеллюлозы с помощью *Medusomyces gisevii* Sa-12 (ВКПМ) в условиях, описанных в работе [6]. Начальная концентрация субстрата 30 г/л, биосинтез бактериальной наноцеллюлозы проводился после завершения ферментативного гидролиза; молочной кислоты с помощью *Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus* (ООО «Барнаульская биофабрика») в условиях, описанных в работе [7]. Начальная концентрация субстрата 90 г/л, биосинтез молочной кислоты проводился после завершения ферментативного гидролиза.

Работа выполнена с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН.

Химический состав мискантуса и субстратов из него приведены в таблице 1. Одностадийная предварительная обработка мискантуса гигантского позволяет повысить содержание гидролизуемых веществ (целлюлозы и гемицеллюлоз) до 90,4–90,8 %, то есть на 13,6–14,0 % по сравнению с нативным мискантусом, а двустадийная обработка позволяет повысить содержание гидролизуемых веществ до 98,3–99,4 %, то есть на 7,5–9,0 % по сравнению с одностадийной обработкой. При этом выход субстратов, полученных двустадийно, на 10,0–18,0 % ниже, чем для субстратов, полученных одностадийно. Явление значительного снижения выхода при понижении доли нецеллюлозных компонентов в продуктах переработки (субстратах) закономерно и хорошо описано для разных видов целлюлозосодержащего сырья.

В таблице 2 приведен материальный баланс процессов получения биотехнологических продуктов мискантуса гигантского. Для трех изучаемых биотехнологических продуктов на основании ранее проделанных работ на стадии ферментативного гидролиза использованы разные начальные концентрации четырех видов субстратов: 30 г/л – для бактериальной наноцеллюлозы, 60 г/л – для биоэтанола, 90 г/л – для молочной кислоты.

Таблица 1. Химический состав мискантуса и субстратов из него

Показатели	Сырьё	Субстраты			
		ПАО	ПЩД	ЦАС	ЦМЩС
М.д. целлюлозы, %	54,0 ± 0,4	83,0 ± 0,4	86,3 ± 0,4	96,9 ± 0,4	94,0 ± 0,4
М.д. пентозанов, %	22,8 ± 0,1	7,4 ± 0,1	4,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	5,3 ± 0,1
М.д. кислотонерастворимого лигнина, %	21,0 ± 0,1	7,5 ± 0,1	9,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
М.д. золы, % (ЖВФ 0,5 % в сырье)	1,7 ± 0,01	2,1 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Сумма гидролизующих веществ, %	76,8 ± 0,3	90,4 ± 0,3	90,8 ± 0,3	99,4 ± 0,3	98,3 ± 0,3
Выход из 100 кг сырья, %	–	50 ± 0,1	48 ± 0,1	32 ± 0,1	38 ± 0,1

Таблица 2 – Материальный баланс процессов получения биотехнологических продуктов из мискантуса гигантского

Показатели	Субстраты			
	ПАО	ПЩД	ЦАС	ЦМЩС
Биоэтанол				
Крепость бражки, об. %	1,7	1,6	1,9	2,0
Концентрация остаточных РВ, г/л	4,2	3,0	2,5	2,8
Выход биоэтанола, % от массы субстрата	39,5	37,2	44,2	46,5
Выход биоэтанола из 1 т мискантуса, дал	19,75	17,80	14,14	17,67
Выход биоэтанола из 1 т мискантуса, кг	155,8	140,4	111,6	139,4
Бактериальная наноцеллюлоза				
Концентрация РВ в гидролизате, г/л	21,5	20,8	21,0	21,0
Выход РВ от массы субстрата, %	65,2	63,0	63,6	63,6
Выход БНЦ от РВ, %	8,7	7,8	10,7	10,4
Выход сухой БНЦ из 1 т мискантуса, кг	28,4	23,6	21,8	25,1
Выход влажной БНЦ из 1 т мискантуса, кг	3550	2950	2725	3137
Молочная кислота				
Концентрация РВ в гидролизате, г/л	59,0	56,0	57,5	56,5
Концентрация молочной кислоты, г/л	28,9	23,5	37,4	35,6
Концентрация остаточных РВ, г/л	13,03	15,78	3,20	4,12
Выход молочной кислоты от РВ, %	49	42	65	63
Выход молочной кислоты из 1 т мискантуса, кг	144,6	112,9	119,6	135,3

Провести сопоставительный анализ стадии ферментативного гидролиза затруднительно, так как биоэтанол получен путем совмещения стадий ферментативного гидролиза и спиртового брожения, поэтому вычленив выход на стадии ферментативного гидролиза не представляется возможным. Имеется общая тенденция: наиболее эффективно стадия ферментативного гидролиза прошла для ПАО, а наименее эффективно – для ПЩД при всех изученных начальных концентрациях субстратов. Мы связываем это с высокой остаточной долей лигнина в ПЩД – 9,0 % (против 7,5 % лигнина в ПАО), что свидетельствует о недостаточной жесткости режима щелочной делигнификации в описываемых условиях для биомассы мискантуса гигантского. По прочности стебли мискантуса гигантского сравнимы с бамбуком, который, как и мискантус, относится к семейству злаковых. Видимо поэтому, классические для недревесного сырья режимы оказались недостаточны.

При анализе стадии микробиологического синтеза общим для всех трех биотехнологических продуктов является достижение большего выхода из субстратов, полученных двухстадийно. Выход продуктов из ЦАС и ЦМЩС очень близок и больше, чем выход из ПАО и ПЩД: на 11–20 % для биоэтанола, на 16–27 % для бактериальной наноцеллюлозы, на 22–35 % для молочной кислоты.

Однако если учесть общий выход продукта на стадиях химической и биотехнологической трансформации, то для всех трех биотехнологических продуктов максимальный выход зафиксирован из ПАО, что объясняется выходом ПАО 50 % на стадии химической предварительной обработки мискантуса. При этом в расчёте на абсолютно сухое вещество максимальный выход из 1 т мискантуса гигантского через ПАО зафиксирован для биоэтанола – 155,8 кг/т, на втором месте молочная кислота – 144,6 кг/т (это 93 % от выхода биоэтанола), минимальный выход зафиксирован для бактериальной наноцеллюлозы – 28,4 кг/т (это 18 % от выхода биоэтанола). Низкий выход бактериальной наноцеллюлозы связан с её низким выходом на стадии биосинтеза и является метаболической особенностью продуцента.

Бактериальная наноцеллюлоза обычно используется во влажном состоянии (влажность наших образцов 99,2 %), поэтому из 1 т мискантуса можно получить 3,5 т бактериальной наноцеллюлозы. В таблице 3 приведено сравнение среднерыночных цен на биотехнологические продукты.

Таблица 3 – Сравнение среднерыночных цен на биотехнологические продукты

Биотехнологический продукт	Цена продажи, доллар/кг	Ссылка	Выход из 1 т мискантуса, кг	Стоимость продукта при переделе 1 т мискантуса, доллар
Биоэтанол	0,7 – минимум 2,4 – максимум	[8]	155,8	109 374
Бактериальная наноцеллюлоза	0,8 – минимум 25,0 – максимум	[9] [10]	3550	2840 88 750
Молочная кислота	1,0 – минимум 4,0 – максимум	[11] [12]	144,6	144,6 578,4

По данным нашего поставщика 1 т мискантуса гигантского продается по цене 800 руб. Самым низкомаржинальным продуктом является биоэтанол, из 1 т мискантуса возможно получить 109–374 доллара. По нашим оценкам, до СВО себестоимость нашего биоэтанола из мискантуса составляла 538 руб./дал, то есть входила в литературный диапазон. В большинстве стран биоэтанол не может конкурировать с бензином. В текущем состоянии биоэтанол второго поколения остается дороже биоэтанола первого поколения в 2,2–7,9 раз (0,57–1,9 \$ / л против 0,24–0,86 \$ / л) и дороже биоэтанола третьего поколения в 1,5–2,5 раз, минимальная цена биоэтанола третьего поколения составляет 0,37–0,75 \$ / л [8].

В отличие от биоэтанола, другие продукты биотехнологического синтеза не продаются по цене ниже себестоимости и не требуют дотаций. Себестоимость 88 %-ной молочной кислоты из целлюлозосодержащего сырья составляет 1,0–4,0 \$/кг [11–12], это сопоставимо с себестоимостью молочной кислоты из зерна кукурузы – 0,84–1,25 \$/кг [13]. Бактериальная наноцеллюлоза является наиболее маржинальным биотехнологическим продуктом и этот природный полимер можно продать в 26–814 раз дороже, чем платформенные химикаты – биоэтанол и молочную кислоту.

Можно сделать вывод, что мискантус гигантский является вполне пригодным сырьём для получения конкурентно способных продуктов биотехнологического синтеза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>

Литература

- Shavyrkina N.A.; Budaeva V.V.; Skiba E.A.; Gismatulina Y.A.; Sakovich G.V. Review of Current Prospects for Using Miscanthus-Based Polymers // Polymers. 2023. Vol. 15, no. 14. 3097. <https://doi.org/10.3390/polym15143097>
- Boakye-Boaten N.A. et al. Techno-economic analysis for the biochemical conversion of Miscanthus x giganteus into bioethanol // Biomass and Bioenergy. 2017. Vol. 98. P. 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.01.017>
- Zhang Y. et al. Diverse lignocellulosic feedstocks can achieve high field-scale ethanol yields while providing flexibility for the biorefinery and landscape-level environmental benefits // GCB Bioenergy. 2018. Vol. 10, no. 11. P. 1–16.
- Sebastian J., Rouissi T., Brar S.K. Miscanthus sp. – Perennial lignocellulosic biomass as feedstock for greener fumaric acid bioproduction // Industrial Crops and Products. 2022. Vol. 175. 114248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114248>
- Skiba E.A. et al. Miscanthus bioprocessing using HNO₃-pretreatment to improve productivity and quality of bioethanol and downstream ethylene // Industrial Crops and Products. 2022. 177. 114448. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114448>
- Skiba E.A., et al. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by Medusomyces gisevii in nutrient media derived from Miscanthus biomass // Carbohydrate Polymers. 2021. 252. 117178, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>
- Shavyrkina NA Obtaining lactic acid from oat husks // Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2021. 11 (1). 99–106. (In Russian)
- Jain, S., & Kumar, S. (2024). A comprehensive review of bioethanol production from diverse feedstocks: Current advancements and economic perspectives. Energy, 131130. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2024.131130>
- Фруктовое желе nata de coco [Электронный ресурс] <https://russian.alibaba.com/g/fruit-jelly-nata-de-coco.html> // (дата обращения 12.08.2024)
- Dourado F., et al. «Chapter 12 – Process modeling and techno-economic evaluation of an industrial bacterial nanocellulose fermentation process», in Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bio-economy, eds M. Gama, F. Dourado, and S. Bielecki (Amsterdam: Elsevier), 2016. – P. 199–214. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-16061-8>
- Manandhar, A., & Shah, A. (2023). Techno-economic analysis of the production of lactic acid from lignocellulosic biomass. Fermentation, 9(7), 641. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070641>
- Ahmad, A., Banat, F., & Taher, H. (2020). A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges. Environmental Technology & Innovation, 20, 101138. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101138>
- Manandhar, A., & Shah, A. (2020). Techno-economic analysis of bio-based lactic acid production utilizing corn grain as feedstock. Processes, 8(2), 199. <https://doi.org/10.3390/pr8020199>

АНАЛИЗ МЕТОДОВ ХРАНЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ

О.С. Веселова¹, А. Андреева¹, С.Г. Давыденко^{1,2}

¹ Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

² ООО «Пивоваренная компания «Балтика», Санкт-Петербург, Россия

Микроорганизмы широко применимы в производстве продуктов питания, медицине и фармацевтике, за счет чего являются частым объектом исследования. Стабильность качества производственных процессов с применением микроорганизмов зависит от физиологического состояния и идентичности генетических особенностей. Снижение активности, выделение нежелательных метаболитов, изменение морфологии, мутация, все это происходит при неправильном хранении микроорганизмов. Существует множество методов хранения микроорганизмов и их использование зависит от цели хранения. Чаще всего они подразделяются на две группы: на непродолжительное время хранения и долговременное хранение.

При хранении культур непродолжительное время могут применяться такие методы как субкультивирование, хранение под минеральным маслом, хранение в воде и водно-солевых растворах, высушивание на твердых носителях, хранение в виде спор, замораживание при температуре от минус 10° до минус 20°. Эти методы относительно недорогие, однако имеют ряд минусов, необходима постоянная проверка культур на микробиологическую чистоту, повышен риск приобретения штаммом генетических мутаций [1]. К методам долгосрочного хранения микроорганизмов относят криоконсервацию, сублимационное высушивание и L-высушивание [2–3]. Данные методы являются самыми эффективными для длительного хранения, благодаря удалению свободной воды из клеток микроорганизмы переходят в состояние анабиоза. К минусам этих методов хранения можно отнести дороговизну, необходимость в специальном оборудовании.

В настоящее время оптимальным методом является лиофилизация, благодаря данному способу микроорганизмы могут сохранять жизнеспособность в течение нескольких лет, однако данный тип хранения не подходит для криочувствительных культур. Известно, что при сублимационной сушке клетки микроорганизмов могут повреждаться, для избежания данной проблемы подбираются точные режимы лиофилизации для конкретной культуры, а также криопротекторы [4].

До сих пор ещё не разработан универсальный метод хранения всех микроорганизмов, в последние годы разрабатывают новые способы хранения, к которым относятся электроформование и электрораспределение, клеточная иммобилизация, использование стрессовых условий. Помимо способов исследуют новые криопротекторы на основе галактоолигосахаридов и пребиотических компонентов [5].

Литература

- [1] Герхардт ф. Хранение микроорганизмов // методы общей бактериологии. Пер. С англ. М.: мир, 1983. С. 512–534.
- [2] Malik, K.A. Liquid-drying of microorganisms using a simple apparatus / K.A. Malik // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1992. – V. 8. – P. 80–82. <https://doi.org/10.1007/BF01200693>
- [3] Morgan, C.A. Preservation of micro-organisms by drying: A review / C.A. Morgan, N. Herman, P.A. White, G. Vesey // Journal of Microbiological Methods. – 2006. – V. 66. – № 2. – P. 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- [4] Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-5-12>
- [5] Alonso, Saúl. “Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures.” (2016). https://doi.org/10.1007/978-3-319-42457-6_2

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА БАВ НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *RHODOTORULA LACTOSA* ВКПМ-У-3868 И ОЦЕНКА ЕГО ВЛИЯНИЯ НА МИКРОФЛОРУ МОДЕЛЬНОЙ СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

К.С. Должикова, М. Делич, К.И. Киенская, И.А. Буторова

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Кожа является средой обитания для миллионов бактерий, вирусов, грибов, архей и простейших, биоразнообразие и баланс которых играют фундаментальную роль в сохранении ее здоровья и развитии ряда хронических воспалительных заболеваний, включая атопический дерматит, акне, псориаз и многое другое [1]. Сохранение и увеличение разнообразия микробиоты кожи сегодня считается одним из перспективных направлений в дерматологии и косметологии. Для реализации данного направления используются различные стратегии, основанные на введении в состав рецептуры компонентов, которые создают благоприятные условия для развития полезной микрофлоры кожи. Это могут быть лизаты микроорганизмов, продукты бактериальной ферментации природных веществ, различные соединения с пребиотической и антиворумной активностью. Наиболее изученной областью с большой доказательной базой является стратегия применения лизатов различных микроорганизмов, среди которых используют в основном лизаты лакто- и бифидобактерий, пропионовокислых бактерий. Встречаются исследования о положительном воздействии на микробиоту кожи лизата бактерий *Vitreoscilla filiformis* и лизата дрожжей-сахаромицетов [2–3].

Большим потенциалом для получения лизатов обладают каротинсинтезирующие дрожжи р. *Rhodotorula*. Помимо биологически активных веществ, которыми традиционно богаты лизаты различных микроорганизмов, лизаты дрожжей р. *Rhodotorula* дополнительно могут быть обогащены комплексом каротиноидов, обладающих широкой биологической активностью: провитаминовой, антиоксидантной, противовоспалительной [4].

Каротиноиды активно и успешно используются в производстве косметической продукции, оказывая положительное воздействие на регенерацию клеток кожи, улучшая ее внешний вид и замедляя процессы старения [5–6]. В последнее время возрастает интерес к таким каротиноидам как торулин и торулародин, продуцентами которых являются только дрожжи и грибы. Помимо антиоксидантных свойств, у данных каротиноидов обнаружена противораковая активность, а торулародин проявляет еще антибактериальные и противогрибковые свойства [7]. Интерес к дрожжам р. *Rhodotorula* обусловлен еще и тем, что они обнаруживаются в составе грибной микробиоты кожи и поэтому продукты их жизнедеятельности не являются чужеродными для кожи [8].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы являлось получение комплекса БАВ на основе каротинсинтезирующих дрожжей *Rhodotorula lactosa* ВКПМ-У-3868 и изучение влияния полученного комплекса на микробиоту кожи.

В лабораторных условиях комплекс БАВ на основе дрожжей *Rhodotorula lactosa* ВКПМ-У-3868 получали по схеме, представленной на рис. 1.

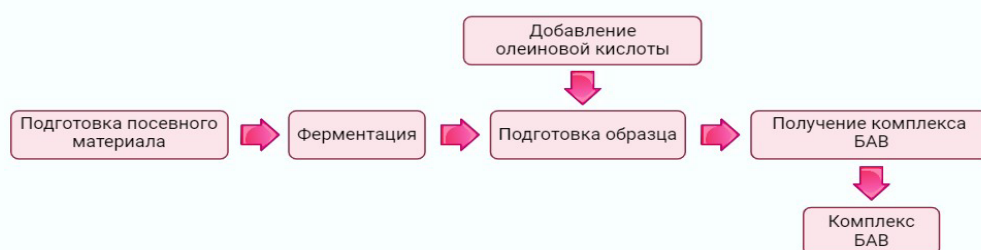


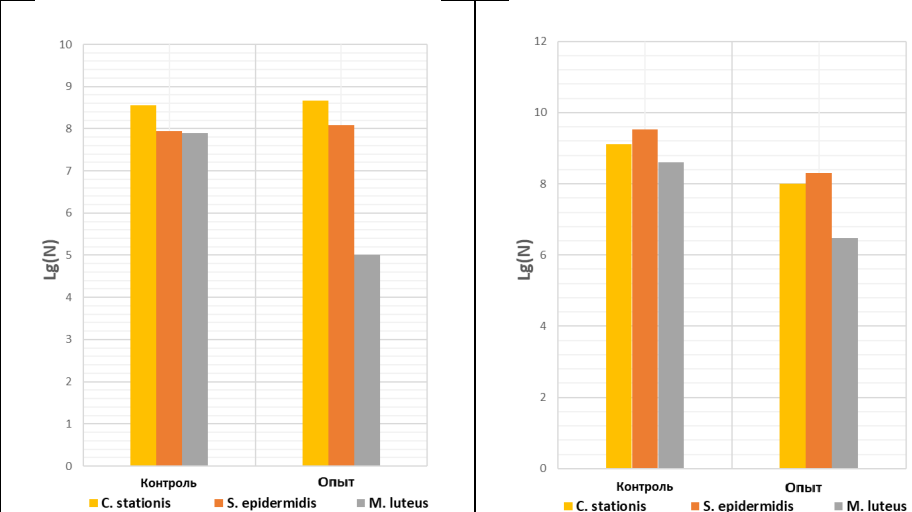
Рис. 1. Принципиальная схема процесса получения комплекса БАВ на основе дрожжей *Rhodotorula lactosa* ВКПМ-У-3868.

Штамм дрожжей выращивали на минеральной среде с глюкозой в течение 48 часов в периодических условиях в шейкере-инкубаторе при 200 об/мин и 30 °С. Затем в полученную дрожжевую суспензию вносили олеиновую кислоту (количество кислоты к дрожжевой суспензии 1:4), доводили pH

реакционной среды до 5,5 и выдерживали полученную смесь в термостате при 40–42° С 4 суток. В результате получали комплекс БАВ, содержащий продукты метаболизма дрожжей с остатками минеральной питательной среды, лизат дрожжей и комплекс каротиноидов. Содержание суммарных каротиноидов в полученном комплексе БАВ составило 217 ± 11 мкг/г, в котором содержание β-каротина составляло 64 %, торулародина 36 %, торулин в комплексе БАВ обнаружен не был.

Было изучено в условиях *in vitro* влияние полученного комплекса на модельную смешанную культуру, состоящую из *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ-В-12635, *Corynebacterium stationis* ВКПМ-В-10645, *Micrococcus luteus* ВКПМ-В-7845, взятых в соотношении 1:1:1. Количество вносимого комплекса БАВ в среду составило 0,0125 об.% и 0,0250 об.%. Засеянные колбы инкубировали при 300 С при перемешивании 200 об/мин в течение 24 часов. Затем из образцов были сделаны рассевы на агаризованную среду и подсчитано количество каждого вида бактерий (табл. 1).

Таблица 1. Влияние комплекса БАВ дрожжей *Rhodotorula lactosa* ВКПМ-У-3868 на рост модельной смешанной культуры микроорганизмов

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов, КОЕ/мл			
	Количество БАВ в среде, об.%			
	Контроль	Опыт (0,125 об.%)	Контроль	Опыт (0,250 об.%)
<i>S. epidermidis</i>	$9,0 \pm 0,5 \cdot 10^7$	$1,2 \pm 0,2 \cdot 10^8$	$3,4 \pm 0,5 \cdot 10^9$	$2,0 \pm 0,3 \cdot 10^8$
<i>C. stationis</i>	$3,6 \pm 0,2 \cdot 10^8$	$4,7 \pm 0,5 \cdot 10^8$	$1,3 \pm 0,2 \cdot 10^9$	$1,0 \pm 0,2 \cdot 10^8$
<i>M. luteus</i>	$1,0 \pm 0,1 \cdot 10^7$	$< 10^6$	$4,0 \pm 0,2 \cdot 10^8$	$3,0 \pm 0,1 \cdot 10^6$
	0,11	<0,008		
	0,03	<0,002		
Гистограмма				

Как показали исследования, при добавлении в среду полученного комплекса БАВ из дрожжей *Rhodotorula lactosa* ВКПМ-У-3868 в количестве 0,0125 об.% обнаружено снижение количества бактерий *Micrococcus luteus* в составе модельной смешанной культуры и некоторое увеличение количества *Staphylococcus epidermidis* и *Corynebacterium stationis* по сравнению с контролем. При увеличении количества БАВ в реакционной среде до 0,0250 об.% отмечалось ингибирование роста всех видов бактерий в составе модельной смешанной культуры, что, вероятно, обусловлено присутствием в составе данного комплекса БАВ торулародина, обладающего антимикробной активностью.

Снижение показателей $\frac{M.luteus}{S.epidermidis}$ с 0, 11 до менее, чем 0,008 и $\frac{M.luteus}{C.stationis}$ с 0,03 до менее чем 0,002 при концентрации комплекса БАВ 0,0125 об.% в среде свидетельствует о избирательном влиянии полученного комплекса БАВ на рост отдельных видов бактерий в составе смешанной культуры и свидетельствует тем самым о потенциальной пребиотической активности полученного комплекса. Это дает основание рассматривать данный комплекс в качестве перспективного компонента, обладающего полезными свойствами для поддержания здоровой микробиоты кожи, и открывает новые горизонты для исследований и применения данного комплекса в области косметологии и дерматологии.

Литература

1. Летяева О.И. Микробиота кожи с точки зрения фундаментальной медицины // Эффективная фармакотерапия. 2020 Т. 16 № 27 С. 22–27. DOI 10.33978/2307–3586–2020–16–27–22–27
2. Yue Wang, et al. Effects of Postbiotic *Saccharomyces* and *Lactobacillus* Ferment Complex on the Scalp Microbiome of Chinese Women with Sensitive Scalp Syndrome. // Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology 2023;16 / 2623–2635.
3. Mahe Y.F., et al. A new *Vitreoscilla filiformis* extract grown on spa water enriched medium activates endogenous cutaneous antioxidant and antimicrobial defenses through a potential Toll-like receptor 2/protein kinase C, zeta transduction pathway. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2013; (6) : 191–196.
4. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids. Handbook. Basel AG.: Springer, 2004. – 646 p.
5. Young A.J., Lowe G.M. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2001. – Volume 10, 20–27.
6. Петрова С.Ю., Альбанова В.И., Ноздрин К.В., Гузев К.С. Основные эффекты воздействия ретинола пальмитатана структуры кожи и принципы его применения в дерматологической практике // Вестник дерматологии и венерологии. – 2023. – Т.99. – № 1. – С. 6–17.
7. Kot A.M., Błażej S., Gientka I., Kieliszek M., Bryś, J. Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry? // Microbial Cell Factories. – 2018, N: 49. – Volume 17.
8. Findley K., et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. // NIH Intramural Sequencing Center Comparative Sequencing Program. – 2013. – 498(7454), 367–370.

УДК 378.14

<https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-3-45>**ОСОБЕННОСТИ МОДЕРНИЗАЦИИ СИСТЕМЫ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ:
РЕЗУЛЬТАТЫ РЕАЛИЗАЦИИ ПИЛОТНЫХ ПРОЕКТОВ****М.Г. Сульман, Г.Н. Демиденко***Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия*

Согласно Указу Президента РФ № 343 «О некоторых вопросах совершенствования системы высшего образования» [1], который был подписан 12.05.2023 г., началась реализация пилотного проекта, направленного на изменение уровней профессионального образования. В рамках действующего законодательства (статья 10 ФЗ № 273 «Об образовании в Российской Федерации» [2]) система высшего образования состоит из нескольких уровней: бакалавриат; специалитет или магистратура; подготовка кадров высшей квалификации: аспирантура (адъюнктура), ординатура и ассистентура-стажировка. Указ устанавливает в обновленной системе высшего образования новое деление [1]: базовое высшее, куда входят бывшие бакалавриат и специалитет; специализированное высшее, которое включает магистратуру, ординатуру и программы ассистентуры-стажировки; профессиональное – новый уровень образования, к которому относится аспирантура. Срок обучения при освоении базового уровня составит от 4 до 6 лет, а специализированного – от 1 года до 3 лет. Например, для подготовки специалистов индустрии гостеприимства, сервиса и туризма или педагогов дошкольного образования достаточно 4-летних программ, а в инженерно-технической и педагогической областях основными будут программы длительностью не менее пяти лет.

Пилотный проект, направленный на преобразование системы высшего образования, стартовал в мае 2023 года, в нем участвуют шесть университетов: Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта; Московский авиационный институт; Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; Московский педагогический государственный университет; Санкт-Петербургский горный университет; Томский государственный университет. В течение учебного года вузы разработали 173 новые образовательные программы, по которым обучается более 5 тысяч человек. Пилотный проект показал целесообразность выделения единого ядра дисциплин, принципиально важных для получения профессии, в образовательных программах соответствующих областей. Единое ядро должно обеспечить два важных эффекта для системы высшего образования в целом. Во-первых, позволит обеспечить общее образовательное пространство от Калининграда до Камчатки независимо от вуза, его ведомственного подчинения и других факторов. Во-вторых, создаст новые возможности для студенческой мобильности и быстрого формирования сетевых программ. Кроме того, все университеты увеличили объем практической подготовки студентов. Предполагается, что это позволит сократить период адаптации молодого специалиста на будущем рабочем месте, на чем сейчас особенно настаивают работодатели. Например, в пилотных программах Университета МИСиС объем практической подготовки вырос в 2–2,5 раза.

1. Указ Президента Российской Федерации от 12.05.2023 № 343 «О некоторых вопросах совершенствования системы высшего образования». Портал Официальное опубликование правовых актов [сайт]: URL: www.pravo.gov.ru

2. Федеральный закон № 273 от 29.12.2012 «Об образовании в Российской Федерации» (последняя редакция). Портал КонсультантПлюс [сайт]: URL: www.consultant.ru (дата обращения 19.07.2024).

К ВОПРОСУ О ВЛИЯНИИ УЛЬТРАЗВУКА НА ПРОЦЕСС КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *CHLORELLA VULGARIS*

М.С. Темнов, В.О. Миленина, А.К. Брянкина, К.И. Меронюк, Д.С. Дворецкий

Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия

Биомасса микроводорослей *Chlorella* является перспективным сырьем для получения пищевых добавок, кормов для сельскохозяйственных животных, медицинских и косметических препаратов, энергоносителей [1]. Эти микроорганизмы в процессе жизнедеятельности для роста и размножения используют энергию света и небольшое количество минеральных солей. В настоящее время наиболее развито периодическое культивирование микроводорослей, которое позволяет получить значительную продуктивность по биомассе, которая превосходит продуктивность высших растений, однако потенциальные возможности этих фотосинтетических микроорганизмов гораздо выше [2]. Рост клеток микроводорослей при периодическом промышленном культивировании ограничен рядом лимитирующих факторов, одним из которых является возникающее при высоких концентрациях в суспензии клеток микроводорослей накопление в культуральной жидкости метаболитов фенольной природы, ингибирующих рост клеток [2]. Вещества фенольной природы могут оказывать ингибирующее воздействие на фиксацию углерода, скорость роста и биосинтез некоторых метаболитов. Так, в работе [3] было выявлено значительное снижение скорости роста, активности нитратредуктазы, содержания хлорофиллов (а и b), общего белка и углеводов у микроводорослей *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus bijugatus* в условиях фенольного стресса. После воздействия фенола на клетки микроводорослей наблюдались некоторые ультраструктурные изменения, такие как исчезновение или сморщивание ядрышек, утолщение клеточной стенки и повреждение хлоропластов.

При этом, в исследовании [4] было выявлено, что воздействие низкочастотного ультразвука (20 кГц) мощностью 125 Вт в течение 180 мин вызвало снижение концентрации фенолов в сточных водах на 10–20 %. Причем, если в воде присутствуют ионы Fe^{2+} в концентрациях всего 10^{-3} г/л, скорость сонолитического разложения обычно увеличивается более чем в 2,5 раза. Предположительно, расщепление фенолов было связано с протеканием свободнорадикальных реакций с участием гидроксильных радикалов и пероксида водорода, которые образовывались в результате гидролиза воды, и/или реакций пиролиза вблизи кавитационных пузырьков. В составе большинства питательных сред, используемых для культивирования микроводорослей, присутствует источник катионов железа (сульфат железа (II)), которые необходимы для функционирования большого количества ферментов и соответственного эффективного протекания реакций метаболизма клеток микроводорослей. В связи с этим, можно ожидать, что воздействие низкочастотного ультразвука (20–30 кГц) может оказать стимулирующее воздействие на рост и размножение клеток микроводорослей рода *Chlorella*.

Цель работы – исследование влияния воздействия низкочастотного ультразвука на процесс периодического культивирования микроводорослей рода *Chlorella*.

Культивирование штамма микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-1 (*Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W. Krauss), полученного из коллекции микроводорослей и цианобактерий Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, осуществлялось в фотобиореакторе (2 л) при аэрации газовой смеси с концентрацией углекислого газа 0,03 % (расход $(3 \pm 0,5)$ л/мин) на среде Тамия в течение 26 суток при температуре 30 ± 1 °C и уровне фотосинтетически активной радиации (ФАР) $125 \pm 0,1$ мкмоль фотонов / (м² с).

Образцы, обрабатывались ультразвуком (УЗ) частотой 20–25 кГц при помощи ультразвукового дезинтегратора Scientz PD, начиная с первого дня культивирования. Мощность и продолжительность воздействия ультразвукового излучения, которым обрабатывались экспериментальные образцы, представлены в табл. 1.

Исследуемые образцы контролировались по содержанию в суспензии живых и погибших клеток, нитрат-анионов и фосфат-анионов. Измерение концентрации клеток в суспензии микроводорослей проводилось методом прямого подсчета в камере Горяева с использованием биологического микроскопа Levenhuk 320 Series согласно методикам [5]. Измерение концентрации нитрат-анионов в культуральной жидкости проводилось спектрофотометрическим методом согласно методике [6]. Определение концентрации фосфат-анионов проводилось фотометрическим методом с восстановлением аскорбиновой кислотой [7].

Таблица 1 – Условия обработки экспериментальных образцов ультразвуком

Образец	Образец 1 (Контроль)	Образец 2	Образец 3	Образец 4
Мощность УЗ, Вт	–	20	160	300
Время, с		60	60	60
Удельная энергия, Дж/мл		4,8	38,4	72

Эксперимент проводился в трех повторениях, и полученные значения являются средними для трех независимых экспериментов. Статистический анализ проводился с использованием SPSS (статистический пакет для социальных наук) версии 20.0. Существенные различия между средними значениями показателей определяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и Post-Нос теста Тьюки при уровне значимости $p < 0,05$.

Анализ экспериментальных данных (табл. 2) показал, что характер кривых роста клеток всех образцов идентичен, но есть существенные различия в величине максимальной концентрации клеток, достигаемой в процессе культивирования. В эксперименте в качестве источника углерода использовалась газовоздушная смесь с содержанием углекислого газа 0,03 %, в связи с чем длительность жизненного цикла клеток составляла в среднем 3 суток (приблизительно 72 ч) [5]. Было замечено (табл. 2), что на первом жизненном цикле культивируемых клеток (0–3 сутки культивирования) у образцов, обработанных ультразвуком, наблюдаются в среднем на 10–20 % более высокая удельная скорость роста клеток по сравнению с контрольным образцом ($\mu = 0,60 \text{ сут}^{-1}$). Это объясняется более эффективным усвоением нитратов из питательной среды: удельная скорость поглощения нитратов у образцов, обработанных ультразвуком, была выше в среднем на 30–40 % по сравнению с контрольным образцом (табл. 2). Это позволяет сделать вывод о том, что ультразвуковое излучение оказывает на функционирование MFC-транспортера нитратов (NCBI-ProteinID: XP_005844791). На данном этапе культивирования (цикл жизнедеятельности клеток 1 (0–3 сутки)) количество фенольных соединений в культуральной жидкости не велико, в связи, с чем активность транспортера увеличивается за счет теплового эффекта ультразвука. Тепловой эффект создается за счет частичного поглощения энергии ультразвука молекулами в результате трения и релаксации. Такое локальное повышение температуры ускоряет перенос нитратов внутрь клетки, но мало влияет на эффективность работы переносчика фосфатов, что подтверждается результатами экспериментов (табл. 2). Наибольшее количество погибших клеток ($1,50 \pm 0,11 \text{ млн кл/мл}$) на первом цикле жизнедеятельности клеток наблюдалось у образца 4 (мощность 300 Вт, удельная энергия 72 Дж/мл), которому сообщалось максимальное количество энергии, вызывающее дезинтеграцию клеток; остальные образцы, обработанные ультразвуком, также содержали погибшие клетки, но их количество статистически значимо не отличалось от контрольного образца ($1,00 \pm 0,07 \text{ млн кл/мл}$ у контрольного образца и образцов 2 и 3). Второй цикл жизнедеятельности клеток (3–6 сутки) характеризуется максимальными величинами удельной скорости роста клеток для всех образцов, причем статистически значимых отличий от контроля не наблюдалось (табл. 2). При этом, в суспензии растет концентрация внеклеточных нитратов, что, по-видимому, связано с разрушением клеток, погибших на предыдущем жизненном цикле (0–3 сутки). Причем у образцов 2–4, которые обрабатывались ультразвуком, удельная скорость накопления нитратов в культуральной жидкости была в среднем выше в 1,2–1,6 раза по сравнению с контрольным. Это объясняется тем, что ультразвук, вероятно, ускоряет дезинтеграцию погибших клеток микроводорослей, что способствует более быстрому выходу клеточных компонентов, в частности нитратов, в межклеточное пространство.

Наибольшая скорость потребления фосфатов на 3–6 сутки культивирования наблюдалась у контрольного образца и составляла $\mu(\text{PO}_4^{3-})_1 = -0,89 \text{ сут}^{-1}$, что на 6–20 % выше, чем у образцов 2–4, обработанных ультразвуком. Это можно объяснить тем, что внутриклеточные фосфаты из погибших клеток попадали в межклеточное пространство и компенсировали поглощение фосфатов живыми клетками, снижая среднюю удельную скорость поглощения.

На 6–9 сутки культивирования (третий цикл жизнедеятельности клеток) наблюдался рост клеток образцов 3 и 4, в то время как концентрация клеток в контрольном образце 1 и образце 2 (20 Вт, 4,8 Дж/мл) уменьшалась (табл. 2). Можно предположить, что на данном этапе культивирования в суспензии накапливается значительное количество экзометаболитов фенольной природы, которые ингибируют процессы жизнедеятельности клеток.

Таблица 2 – Результаты экспериментальных исследований

Образец	Клетки	Погибшие клетки	Нитраты	Фосфаты
Начальные концентрации (0 сутки)				
№ 1 (Контроль)	0,50 ± 0,04 млн кл/мл	0 млн кл/мл	2375,22 ± 166,27 мкг/мл	173,75 ± 6,95 мг/л
№ 2				
№ 3				
№ 4				
Удельные скорости				
Цикл жизнедеятельности клеток 1 (0–3 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 0,60 сут-1)	0	↓* (μ = -0,19 сут-1)	↓ (μ = -0,16 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 0,65 сут-1)		↓ (μ = -0,25 сут-1)	↓ (μ = -0,16 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,66 сут-1)		↓ (μ = -0,27 сут-1)	↓ (μ = -0,14 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,73 сут-1)		↓ (μ = -0,28 сут-1)	↓ (μ = -0,18 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 2 (3–6 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 1,06 сут-1)	↑ (μ = 0,90 сут-1)	↑ (μ = 0,17 сут-1)	↓ (μ = -0,89 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 1,06 сут-1)	↑ (μ = 0,54 сут-1)	↑ (μ = 0,22 сут-1)	↓ (μ = -0,71 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 1,05 сут-1)	↑ (μ = 0,90 сут-1)	↑ (μ = 0,20 сут-1)	↓ (μ = -0,83 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 1,04 сут-1)	↑ (μ = 0,40 сут-1)	↑ (μ = 0,27 сут-1)	↓ (μ = -0,84 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 3 (6–9 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↓ (μ = -0,08 сут-1)	↑ (μ = 0,10 сут-1)	↔ (μ = 0,01 сут-1)	↓ (μ = -0,46 сут-1)
№ 2	↓ (μ = -0,04 сут-1)	↑ (μ = 0,65 сут-1)	↔ (μ = 0,03 сут-1)	↓ (μ = -0,64 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,10 сут-1)	↑ (μ = 0,10 сут-1)	↔ (μ = 0,03 сут-1)	↑ (μ = 0,23 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,10 сут-1)	↑ (μ = 0,37 сут-1)	↔ (μ = -0,02 сут-1)	↓ (μ = -1,28 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 4 (9–12 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↔ (μ = 0,05 сут-1)	↓ (μ = -0,10 сут-1)	↔ (μ = -0,02 сут-1)	↑ (μ = 0,35 сут-1)
№ 2	↓ (μ = -0,12 сут-1)	↓ (μ = -0,19 сут-1)	↓ (μ = -0,12 сут-1)	↔ (μ = -0,05 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,08 сут-1)	↔ (μ = 0 сут-1)	↓ (μ = -0,12 сут-1)	↔ (μ = -0,02 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,10 сут-1)	↑ (μ = 0,17 сут-1)	↓ (μ = -0,11 сут-1)	↑ (μ = 0,94 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 5 (12–15 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 0,18 сут-1)	↔ (μ = 0 сут-1)	↑ (μ = 0,11 сут-1)	↑ (μ = 1,96 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 0,47 сут-1)	↓ (μ = -0,23 сут-1)	↑ (μ = 0,08 сут-1)	↑ (μ = 0,72 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,24 сут-1)	↓ (μ = -0,23 сут-1)	↔ (μ = -0,03 сут-1)	↑ (μ = 0,76 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,24 сут-1)	↓ (μ = -0,31 сут-1)	↑ (μ = 0,07 сут-1)	↑ (μ = 0,50 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 6 (15–18 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 0,14 сут-1)	↑ (μ = 0,30 сут-1)	↑ (μ = 0,23 сут-1)	↓ (μ = -0,11 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 0,17 сут-1)	↑ (μ = 0,35 сут-1)	↔ (μ = 0,01 сут-1)	↓ (μ = -0,37 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,25 сут-1)	↑ (μ = 0,27 сут-1)	↔ (μ = -0,01 сут-1)	↓ (μ = -0,14 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,25 сут-1)	↑ (μ = 0,45 сут-1)	↔ (μ = 0,01 сут-1)	↓ (μ = -0,65 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 7 (18–21 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 0,16 сут-1)	↑ (μ = 0,42 сут-1)	↔ (μ = -0,01 сут-1)	↓ (μ = -0,80 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 0,42 сут-1)	↑ (μ = 0,84 сут-1)	↔ (μ = -0,04 сут-1)	↑ (μ = 0,18 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,42 сут-1)	↑ (μ = 1,13 сут-1)	↔ (μ = -0,02 сут-1)	↓ (μ = -0,60 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,42 сут-1)	↑ (μ = 0,92 сут-1)	↓ (μ = -0,09 сут-1)	↑ (μ = 0,51 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 8 (21–24 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 0,28 сут-1)	↑ (μ = 0,37 сут-1)	↓ (μ = -0,06 сут-1)	↑ (μ = 0,25 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 0,07 сут-1)	↑ (μ = 0,33 сут-1)	↓ (μ = -0,08 сут-1)	↓ (μ = -0,30 сут-1)
№ 3	↔ (μ = -0,03 сут-1)	↑ (μ = 0,27 сут-1)	↓ (μ = -0,15 сут-1)	↓ (μ = -0,14 сут-1)
№ 4	↔ (μ = -0,03 сут-1)	↑ (μ = 0,16 сут-1)	↓ (μ = -0,12 сут-1)	↓ (μ = -0,10 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 9 (24–26 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↓ (μ = -0,28 сут-1)	↔ (μ = -0,04 сут-1)	-	↔ (μ = -0,01 сут-1)
№ 2	↓ (μ = -0,41 сут-1)	↓ (μ = -0,21 сут-1)	-	↔ (μ = -0,05 сут-1)
№ 3	↓ (μ = -0,24 сут-1)	↓ (μ = -0,39 сут-1)	-	↓ (μ = -0,20 сут-1)
№ 4	↓ (μ = -0,24 сут-1)	↓ (μ = -0,39 сут-1)	-	↑ (μ = 0,08 сут-1)
* условные обозначения: ↓ – уменьшение концентрации; ↑ – увеличение концентрации; ↔ – концентрация статистически значимо не поменялась				

Ультразвуковое воздействие высокой мощности 160 Вт (образец 3) и 300 Вт (образец 4) сообщает в обрабатываемую среду достаточное количество энергии (38,4 Дж/мл для образца 3 и 72 Дж/мл для образца 4), которое (при наличии катализаторов Fe^{2+}) разрушает фенольные экзометаболиты. В связи с этим, на 9-е сутки культивирования появляются статистически значимые различия между ростом

образцов 1 (контроль), 2 и образцами 3,4. На 9–10 сутки культивирования в суспензии микроводорослей, культивируемой в условиях образца 2 (20 Вт, 4,8 Дж/мл) наблюдалось значительное количество погибших клеток (35–40 млн кл/мл), что может быть связано с воздействием фенольных соединений и усиленным воздействием ультразвука. В результате таких стрессовых условий разрушилось большое количество клеток (более 50 % через 2 дня культивирования), таким образом в культуральную жидкость попало большое количество катионов металлов, которые стимулировали каталитическое расщепление фенольных экзометаболитов под действием ультразвука. Это привело к значительному увеличению средней удельной скорости роста клеток образца 2 на пятом цикле жизнедеятельности ($\mu = 0,47 \text{ сут}^{-1}$), что в 2,6 раза выше, по сравнению с контрольным образцом. На 15 сутки минимальная концентрация клеток в суспензии наблюдалась у контрольного образца 1 (132 млн кл/мл), что статистически значимо отличалось от образца 2 (218 млн кл/мл) и образцов 3 (235 млн кл/мл) и 4 (278 млн кл/мл). Максимальная концентрация клеток у образца 1 (контроль) наблюдается на 24 сутки и составляет 725 млн кл/мл, что в 2,3 раза меньше максимальной концентрации клеток образца 2 – $1655,00 \pm 115,85$ млн кл/мл, наблюдаемой на 22 сутки, и в 2,1 раза и 2,4 ниже максимальной концентрации клеток (21 сутки культивирования) у образца 3 – $1536,50 \pm 107,56$ млн кл/мл) и образца 4 – $1752,50 \pm 122,68$ млн кл/мл.

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что воздействие низкочастотного ультразвука (20–30 кГц) мощностью 20–300 Вт в течение 60 с оказывает статистически значимое стимулирующее воздействие на рост и размножение клеток микроводорослей рода *Chlorella*.

Литература

1. Вопросы разработки эффективной биотехнологии синтеза ценных компонентов из биомассы микроводорослей / Д.С. Дворецкий, М.С. Темнов, И.В. Маркин [и др.] // Теоретические основы химической технологии. – 2022. – Т. 56, № 4. – С. 418–433.
2. Цоглин, Л.Н. Биотехнология микроводорослей / Л.Н. Цоглин, Н.А. Пронина. – М: Научный мир, 2012. – 184 с.
3. Megharaj, M. Effects of phenolic compounds on growth and metabolic activities of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil / M. Megharaj, H.W. Pearson, K. Venkateswarlu // Plant and Soil. -1992. – Vol. 140, № 1. – P. 25–34.
4. Papadaki, M. Sonocatalytic oxidation processes for the removal of contaminants containing aromatic rings from aqueous effluents / M. Papadaki // Separation and Purification Technology. – 2004. – Vol. 34, № 1. – P. 35–42.
5. Митрошина, Е.В. Определение жизнеспособности клеточных культур: учебно-методическое пособие / Е.В. Митрошина, Т.А. Мищенко, М.В. Ведунова. – Нижний Новгород: ННГУ, 2015. – 21 с.
6. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures / Y. Collos, F. Mornet, A. Sciandra [et al.] // Journal of Applied Phycology. – 1999. – Vol. 11, № 2. – P. 179–184.
7. ПНД Ф 14.1:2.4.112–97. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации фосфат-ионов в питьевых, поверхностных и сточных водах фотометрическим методом с молибдатом аммония. – Москва: ФБУ «ФЦАО», 2010. – 26 с.

ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧНОСТИ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ ИЗ БИОМАССЫ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО**Н.А. Шавыркина***Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН, Бийск, Россия*

Мискантус гигантский (*Miscanthus × giganteus*) представляет собой перспективную энергетическую культуру в фитотехнологии производства биомассы [1]. Биомасса, как широко распространенный и доступный возобновляемый ресурс, обладает большим потенциалом в замене невозобновляемых ископаемых источников энергии. Мискантус считается превосходной энергетической культурой второго поколения для производства биотоплива [2]. Мискантус относится к многолетним растениям и может эффективно наращивать биомассу более 20 лет. Благодаря своей высокой плодovitости и устойчивости к вредителям и болезням он требует меньше удобрений и может давать урожай до 30 т/га в год. Кроме того, мискантус можно выращивать на малоплодородных землях, сводя к минимуму конкуренцию за продовольствие и использование пахотных земель [3].

Оборотной стороной остро стоящей проблемы энергетического обеспечения потребностей населения Земли является необходимость улучшения экологической обстановки на планете, которая на данный момент становится катастрофической. В процессе роста биомасса связывает углекислый газ и обеспечивает отрицательный углеродный баланс, а при её технологической переработке достигается критерий углеродной нейтральности, что крайне важно в современных условиях [4]. Одним из возможных путей снижения углеродного следа является культивирование растений с высокой скоростью роста, интенсивным уровнем биосинтеза и образованием значительного количества биомассы. При культивировании такие растения активно поглощают углекислый газ, выделяют кислород, их биомасса может служить сырьем для химических и биотехнологических трансформаций [5]. К таким экологически и промышленно перспективным растениям можно отнести мискантус. Кроме непосредственного использования в качестве источника энергии при сжигании, растительная биомасса может иметь множество приложений в качестве исходного сырья для всевозможных производств: в составе композитных материалов, в качестве сырья для фракционной переработки с извлечением целлюлозы, лигнина и других ценных веществ (гидроксиметилфурфурола, фурфурола, фенолов) для последующего химического синтеза широко спектра продуктов, а так же представлены возможности биотехнологической трансформации биомассы мискантуса сначала в углеводные питательные среды, а затем в конечные продукты микробиологического синтеза [6,7]. Разработка технологий получения широкого спектра высокоценных продуктов на основе растительной биомассы во всех областях человеческой деятельности однозначно будет способствовать улучшению экологической ситуации на планете.

В данном исследовании приведены данные о возможных направлениях биотехнологической переработки биомассы мискантуса гигантского с расчетом факторов экологичности реализуемых процессов (суммарное количество отходов/ суммарное количество целевых продуктов) [8] – таким образом, чем ниже значение этого фактора, тем процесс более экологичен.

Биомасса мискантуса гигантского (сорт КАМИС) была предоставлена ООО «Мастер Брэнд», г. Москва, Россия. Предварительную обработку биомассы мискантуса гигантского проводили 4-мя способами [9], в результате получали 4 субстрата для дальнейшей переработки в различные продукты: ПАО (продукт азотнокислой обработки, 1 стадия обработки HNO_3); ПЩД (продукт щелочной делигнификации, 1 стадия обработки NaOH); ЦАС (техническая целлюлоза азотнокислый способ, 2 стадии обработки – сначала HNO_3 , потом NaOH); ЦМЩС (техническая целлюлоза модифицированный щелочной способ, 2 стадии обработки – сначала NaOH , потом HNO_3).

Далее, эти четыре субстрата были подвергнуты ферментативному гидролизу с помощью композиции из ферментных препаратов Целлюлюкс-А («Сиббиофарм, Россия») и «Ультрафло Коре» («Novozymes A/S», Дания). Полученные глюкозные питательные среды подвергали сбраживанию различными продуцентами и получали продукты биотехнологической трансформации: биоэтанол, бактериальная наноцеллюлоза, молочная кислота.

В таблице 1 приведены выходы основных и побочных продуктов из 1 т биомассы мискантуса гигантского, и экологические факторы получения основных продуктов. В процессе предобработки происходит извлечение лигнина из биомассы. При первичном воздействии азотной кислоты

(ПАО, ЦАС) происходит гумификация органических веществ мискантуса и образующийся раствор можно использовать в качестве лигногуминового удобрения; при первичном воздействии щелочи (ПЩД, ЦМЩС) образуется концентрированный щелочной раствор, содержащий извлеченные органические вещества, он может быть реализован для получения бетона повышенной прочности в строительстве [10], либо может быть использован для выделения лигнина и получения его производных [11].

Таблица 1 – Выход основной и побочной продукции, кг из 1 т мискантуса гигантского с указанием факторов экологичности получения основных продуктов

Продукция	Способы химической предварительной обработки			
	ПАО	ПЩД	ЦАС	ЦМЩС
Платформа: лигнин				
Основные продукты				
Комбинированное лигногуминовое удобрение	2200	–	2200	–
Отработанный раствор NaOH	–	2200	–	2200
Побочные продукты				
Промывные воды (после HNO ₃)	20000	–	20000	20000
Промывные воды (после NaOH)	–	20000	20000	20000
С6-платформа: биоэтанол				
Основные продукты				
Биоэтанол	155,8	140,0	111,6	139,4
CO ₂	120	107	85	106
Побочные продукты				
Барда	6900	6700	4400	5200
Сивушные масла	0,4	0,7	0,2	0,3
Эфиральдегидный концентрат	0,6	0,7	0,4	0,5
Лютерная вода	230	240	200	210
Фактор экологичности	11,0	11,0	18,6	18,6
С6-платформа: бактериальная nanoцеллюлоза				
Основные продукты				
Бактериальная nanoцеллюлоза	2840	2360	2180	2510
Побочные продукты				
Отработанная культуральная жидкость	11070	10520	6520	7810
Потери культуральной жидкости на испарение	2390	2220	1500	1780
Промывные воды (после NaOH)	7100	5900	5500	6300
Промывные воды (после HCl)	7100	5900	5500	6300
Фактор экологичности	8,3	8,6	11,0	11,7
С6-платформа: молочная кислота				
Основные продукты				
Молочная кислота	145	113	120	135
Побочные продукты				
Отработанная культуральная жидкость	4855	4687	3080	3665
Гипс	110	85	90	105
Фактор экологичности	10,6	10,7	18,6	18,7

При расчете факторов экологичности для каждого продукта биотрансформации учитывали продукты, получаемые на стадии предварительной обработки сырья: к сумме целевых продуктов прибавляли основные продукты стадии предобработки (лигногуминовое удобрение или отработанный раствор NaOH), а к сумме отходов прибавляли суммарное количество промывных вод.

Оценивая полученные экспериментальные и расчетные данные, можно проследить следующие тенденции: самый высокий выход всех целевых продуктов был получен в случае одностадийной предварительной обработки биомассы мискантуса гигантского (ПАО, ПЩД), при этом факторы экологичности для процессов получения этих продуктов имели самые низкие значения – 11,0 при получении биоэтанола, 8,3 и 8,6 при получении бактериальной nanoцеллюлозы, 10, 6 и 10,7 при получении молочной кислоты соответственно. И самым экологичным биотехнологическим процессом трансформации биомассы мискантуса в промышленные продукты является получение бактериальной nanoцеллюлозы. Применение двухстадийной предварительной обработки сырья приводит к повышению факторов экологичности в 1,7 раза при получении биоэтанола, в 1,3 раза при получении БНЦ, в 1,8 раза при получении молочной кислоты.

Таким образом, при оценке экологичности процессов получения биотехнологических продуктов из биомассы мискантуса гигантского, можно утверждать, что для минимизации экологических последствий, для предварительной обработки биомассы необходимо применять одностадийную предварительную обработку азотной кислотой.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>.

Литература

1. Mamirova A., Pidlisnyuk V. The Economic and Environmental Aspects of Miscanthus× giganteus Phytomanagement Applied to Non-Agricultural Land // *Agronomy*. – 2024. – Vol. 14. – №. 4. – P. 791. <https://doi.org/10.3390/agronomy14040791>
2. Ma Y. et al. The economic and environmental sustainability of converting Miscanthus to hydrocarbon biofuel by pyrolysis and catalytic hydrotreatment // *Biomass and Bioenergy*. – 2024. – Vol. 181. – P. 107041. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.107041>
3. Tian H. et al. Techno-economic analysis of developing miscanthus biorefinery for the production of platform chemicals and renewable resins // *Journal of Cleaner Production*. – 2023. – Vol. 427. – P. 139172. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.139172>
4. Al Souki K.S. et al. Enhanced carbon sequestration in marginal land upon shift towards perennial C4 Miscanthus× giganteus: a case study in North-Western Czechia // *Agronomy*. – 2021. – Vol. 11. – №. 2. – P. 293. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020293>
5. Velvizhi, G. Valorisation of lignocellulosic biomass to value-added products: Paving the pathway towards low-carbon footprint / G. Velvizhi, C. Goswami, N.P. Shetti et al. // *Fuel*. – 2022. – Vol. 313. – P. 122678. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.122678>
6. Shavyrkina N.A. et al. Review of current prospects for using Miscanthus-based polymers // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – №. 14. – P. 3097. <https://doi.org/10.3390/polym15143097>
7. Götz M. et al. Processing Miscanthus to high-value chemicals: A techno-economic analysis based on process simulation // *GCB Bioenergy*. – 2022. – Vol. 14. – №. 4. – P. 447–462. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12923>
8. Ovchinnikova E.V. et al. Bioprocessing of oat hulls to ethylene: Impact of dilute HNO₃-or NaOH-pretreatment on process efficiency and sustainability // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. – 2021. – Vol. 9. – №. 49. – P. 16588–16596. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c05112>
9. Skiba E.A., Gladysheva E.K., Golubev D.S., Budaeva V.V., Aleshina L.A., Sakovich G.V., Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from Miscanthus biomass // *Carbohydrate Polymers*. – 2021. – Vol. 252. – P. 117178, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>
10. Makul N. Modern sustainable cement and concrete composites: Review of current status, challenges and guidelines // *Sustainable Materials and Technologies* / 2020. 25. e00155. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2020.e00155>
11. Brienza, F., Cannella, D., Montesdeoca, D., Cybulska, I., & Debecker, D.P. (2024). A guide to lignin valorization in biorefineries: traditional, recent, and forthcoming approaches to convert raw lignocellulose into valuable materials and chemicals. *RSC Sustainability*, 2(1), 37–90. <https://doi.org/10.1039/D3SU00140G>

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ БИОСЕНСОРА С ФЕРМЕНТПОЛИМЕРНЫМ ПОКРЫТИЕМ

Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, М.Г. Сульман, А.И. Сидоров, В.Г. Матвеева

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

В последние десятилетия биосенсирование зарекомендовало себя как инновационный аналитический метод сразу в нескольких научных областях: как в области окружающей среды, так и во многих биомедицинских приложениях. Биосенсор представляет собой устройство безреагентного анализа соединений. Высокая специфичность ферментов позволяет количественно определять индивидуальное вещество либо группу родственных веществ в сложных биологических смесях.

Измерения электрохимического отклика проводили с использованием импульсного потенциостата-гальваностата "Р-40Х". Электрохимические измерения выполнены в 0.1 М фосфатном буфере с pH 6.2–8.4, деаэрированном аргоном. D-глюкозоселективный электрод был приготовлен путем последовательной пропитки графитового электрода растворами поливинипирролидона (ПВП), хитозана (Chit), глутаровым диальдегидом (GA) и растворами окислительно-восстановительных ферментов (глюкооксидазы и пероксидазы) GOx/HRP. Исследуемый образец ферментполимерной композиции обозначили в работе ПВП/Chit /GA/HRP/GOx. Полученные хроноамперограммы, представлены на рисунке для концентраций анализируемого вещества D-глюкозы от 50 до 500 мкМ (каждая точка на оси абсцисс соответствует увеличению количества D-глюкозы на 50 мкМ), в присутствии Chit/GA (красная кривая: 50 мкМ, Chit/GA синяя кривая: 100 мкМ Chit/GA, зеленая кривая: 150 мкМ Chit/GA) и в отсутствие Chit/GA (черная линия).

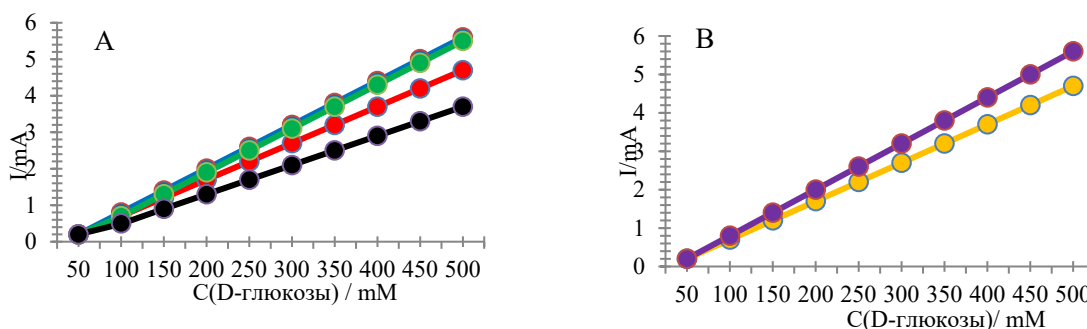


Рисунок. Зависимость амперометрического отклика от концентрации D-глюкозы

Следует подчеркнуть, что для сшитых пленок наблюдались стабильные устойчивые токи при каждом добавлении D-глюкозы (рисунок А), чего нельзя сказать о несшитых пленках (рисунок В). Более того, как видно из калибровочных графиков простых электродов ПВП/Chit/GA/GOx/HRP, модификация Chit/GA также увеличивала чувствительность электродов (рисунок В, фиолетовая линия). По-видимому, ковалентное сшивание GOx/HRP с цепями Chit/GA улучшает стабильность фиксации GOx/HRP без негативного влияния на подвижность субстрата внутри иммобилизационного слоя. Сравнение калибровочных графиков для трех концентраций Chit/GA показало умеренную концентрационную зависимость для аллостерической активации GOx/HRP, причем максимальная стимуляция достигается при концентрации эффектора 100 мМ, что соответствует 400-кратному молекулярному избытку молекул Chit/GA в растворе электролита над единицами GOx/HRP на электроде.

Репрезентативные амперометрические записи в присутствии (рисунок А, красные, синие и зеленые линии прямых) и в отсутствие (черная линия прямой) модифицирующих сшивающих агентов Chit/GA показали стабильный сенсорный ответ на D-глюкозу, даже при ее высоких концентрациях.

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСТРАКЦИИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ В БАКТЕРИЯХ ДВУХЦЕПОЧНЫХ РНК ДЛЯ БОРЬБЫ С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ ПАТОГЕНАМИ ПОЛЕЗНЫХ НАСЕКОМЫХ И ВРЕДИТЕЛЯМИ

Р.Р. Фадеев¹, В.В. Долгих¹

¹ Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, г. Пушкин, Россия

РНК-интерференция (РНКи) – это описанный в конце двадцатого века процесс подавления транскрипционной активности генов у эукариотических организмов, который индуцируется попаданием в клетку комплементарных молекул двухцепочных РНК (дцРНК) [1]. Практически сразу после его открытия было показано успешное подавление активности генов у различных насекомых-вредителей, а также грибных и вирусных фитопатогенов [2–4]. К настоящему времени также показана возможность использования РНКи для борьбы с такими опасными внутриклеточными паразитами одомашненных насекомых, как микроспоридии [5–6].

Важным условием практического использования РНКи в сельскохозяйственной практике является высокая эффективность и низкая себестоимость наработки и выделения эффекторных молекул дцРНК. Для синтеза дцРНК были разработаны различные стратегии наработки в условиях *in vivo* и *in vitro*. Синтез *in vitro* позволяет получать чистые дцРНК, но сам метод является дорогостоящим. Напротив, синтез дцРНК *in vivo* в бактериях имеет значительно более низкую себестоимость, что важно при массовом производстве. В то же время он требует оптимизации не только условий наработки дцРНК в бактериях, но и их выделения.

В наших исследованиях мы провели работу по оптимизации условий экстракции и очистки дцРНК, синтезированных в бактериях *E. coli* HT115(DE3), и показали эффективность их возможного использования в сельскохозяйственной практике. В частности, было показано значительное подавление развитие инфекции медоносной пчелы *Apis mellifera*, вызванной таким внутриклеточным паразитом, как микроспоридия *Vairimorpha (Nosema) ceranae*. В целом, для борьбы с внутриклеточными патогенами полезных насекомых было бы удобнее использовать HIGS стратегию (англ. host-induced gene silencing), подразумевающую генную модификацию организма хозяина, но по причине сложной социальной структуры пчелиной семьи, данный подход сильно затруднён. В нашей работе наработанные в бактериях дцРНК добавляли в сахарный сироп при кормлении насекомых. Эффективность использования синтезированных в бактериях дцРНК, сопоставимая с эффективностью добавления в корм синтезированных *in vitro* молекул, была также показана на личинках колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*.

Работа выполнена при поддержке РНФ, № 23-16-00247

Литература

- 1 Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806–811.
- 2 Petek M., Coll A., Ferenc R., Razinger J., Gruden K. Validating the potential of double-stranded RNA targeting colorado potato beetle mesh gene in laboratory and field trial. *Frontiers of plant science*, 2020, 11: 1250 (doi: 10.3389/fpls.2020.01250).
- 3 Koch A., Biedenkopf D., Furch A., Weber L., Rossbach O., Abdellatif E., Linicus L., Johannsmeier J., Jelonek L., Goesmann A., Cardoza V., McMillan J., Mentzel T., Kogel K.H. An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLOS Pathogens*, 2016, 12: e1005901 (doi: 10.1371/journal.ppat.1005901).
- 4 Tenllado F., Martínez-García B., Vargas M., Díaz-Ruiz J.R. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnology*, 2003, 3: 3 (doi: 10.1186/1472-6750-3-3).
- 5 Nitzan Paldi, Eitan Glick, Maayan Oliva, Yaron Zilberberg, Lucie Aubin, Jeffery Pettis, Yanping Chen, and Jay D. Evans. Effective Gene Silencing in a Microsporidian Parasite Associated with Honeybee (*Apis mellifera*) Colony Declines. *Applied and environmental microbiology*, Sept. 2010, p. 5960–5964 (doi:10.1128/AEM.01067-10).
- 6 He, N.; Zhang, Y.; Duan, X.L.; Li, J.H.; Huang, W. – F.; Evans, J.D.; DeGrandi-Hoffman, G.; Chen, Y.P.; Huang, S.K. RNA Interference-Mediated Knockdown of Genes Encoding Spore Wall Proteins Confers Protection against *Nosema ceranae* Infection in the European Honey Bee, *Apis mellifera*. *Microorganisms* 2021, 9, 505. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030505>

ШТАММ БЦЖ С НОКАУТИРОВАННЫМ ГЕНОМ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ**М.С. Шумков, А.В. Гончаренко**

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Циклический 3',5'-АМР (сАМР) является одним из наиболее широко распространённых вторичных мессенджеров бактерий, архей и эукариот [1].

Аденилатциклазы микобактерий, осуществляющие синтез сАМР, представлены большим количеством различных генов. Для многих бактерий, но не для микобактерий, передача сигналов сАМР связана с классической системой катаболитной репрессии [2]. У микобактерии туберкулеза (*Mtb*) уровень сАМР регулирует иные метаболические пути, в том числе взаимодействие патогена с хозяином [3].

Ранее мы показали, что гиперэкспрессия гена аденилатциклазы (AC) *Rv2212* в *Mtb* усиливает вирулентность рекомбинантного штамма. Клетки, гиперэкспрессирующие AC, демонстрировали значительно более высокую скорость роста в легких и селезенке инфицированных мышей по сравнению с контрольным штаммом и, в отличие от контрольного штамма, приводили к гибели устойчивых к туберкулёзу мышей. Кроме того, гиперэкспрессия *Rv2212* препятствовала переходу *Mtb* в покоящееся состояние [4].

Штамм *Mycobacterium bovis* BCG (БЦЖ) давно и успешно используется как живой вакцинный препарат для профилактики туберкулеза и постоперационной иммунотерапии рака мочевого пузыря. Клетки вакцинного штамма длительно персистируют в организме и формируют эффективный иммунитет против всех форм туберкулеза у детей и нелёгочных форм туберкулеза у взрослых. Однако при ослаблении иммунитета БЦЖ, введённый с целью вакцинации или иммунотерапии, способен сам формировать очаг инфекции. Мы предположили, что удаление кодирующего аденилатциклазу гена *BCGR_2410*, аналога *Rv2212*, приведет к дополнительной аттенуации вакцинного штамма БЦЖ, что в дальнейшем, при подтверждении его меньшей вирулентности и сохранении протективных свойств, позволит использовать полученный штамм как более безопасную альтернативу вакцинного варианта.

Поскольку для получения рекомбинантного вакцинного штамма неприемлемо использование селективных маркеров, мы применили метод гомологичной рекомбинации с использованием системы *p2Nil-Goal* с целью получения немаркированных делеций [5]. В вектор *p2Nil* были клонированы плечи гомологии длиной около 1000 п.о., фланкирующие ген *BCGR_2410*, после чего проведены два раунда гомологичной рекомбинации. В результате получен клон штамма *Mycobacterium bovis* BCG Δ *BCGR_2410* с немаркированным нокаутом гена *BCGR_2410*. Дальнейшие исследования протективности и безопасности полученного рекомбинантного вакцинного штамма позволят оценить перспективы его использования для профилактики туберкулёза и в терапии злокачественных новообразований.

Литература

1. Botsford J., Harman J. // *Microbiol Rev* 1992. V. 56(1). P. 100–22.
2. De Carvalho L., Fischer S., Marrero J., Nathan C., Ehrh S., Rhee K. // *Chem Biol* 2010. V. 29; 17(10). P. 1122–31.
3. Bai G., Schaak D., McDonough K. // *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009. V. 55(1). P. 68–73.
4. Shleeve M., Kondratieva T., Demina G., Rubakova E., Goncharenko A., Apt A., Kaprelyants A. // *Front Cell Infect Microbiol* 2017. V. 7. P. 370.
5. Parish T., Stoker N.G. // *Microbiology (Reading)* 2000. V. 146 (8). P. 1969–1975.

ПРОБЛЕМЫ С РЕАЛИЗАЦИЕЙ ФГОС-4***Р.Р. Бизлов****МИРЭА – Российский технологический университет, г. Москва, Россия*

С 1 сентября 2026 г. планируется переход образовательных организаций высшего образования на новые Федеральные государственные образовательные стандарты (ФГОС-4)¹. Проекты стандартов были сданы Федеральными учебно-методическими объединениями в системе высшего образования (ФУМО) в Минобрнауки России для утверждения ещё в июне 2023 г., однако до сих пор не утверждены. Отчасти², наверное, это связано с тем, что в мае 2023 г. Президент Российской Федерации подписал указ "О некоторых вопросах совершенствования системы высшего образования". В соответствии с этим указом в 2023/2024 и 2025/2026 учебных годах должен быть реализован пилотный проект, направленный на изменение уровней профессионального образования. Реализация этого пилотного проекта поручено 6 вузам.

По всей видимости проекты ФГОС-4 должны быть скорректированы с изменениями в системе высшего образования, которые введены Указом президента и апробированы в ходе выполнения пилотного проекта. Однако ещё в ходе реализации предыдущего образовательного стандарта ФГОС-3++ возникла проблема, которая не была решена в ФГОС-4.

Дело в том, что в ФГОС-3 отказались от Государственных требований к минимуму содержания образовательных программ и уровню подготовки выпускника, которые были в предыдущих версиях образовательного стандарта. Предполагалось, что такой минимум содержания будет прописан в Примерных основных образовательных программах (ПООП), которые должны будут разработать ФУМО. ФГОС стал более либеральным, дал больше свободы образовательным организациям. А ПООП должен был быть образцом для проектирования образовательных программ в каждом конкретном вузе. Из ФГОС исчезли названия учебных дисциплин, их содержание. Остались только компетенции, да и то не все – профессиональные компетенции также должны были быть записаны в ПООП. Получилась коллизия между государственным стандартом (ФГОС) и рекомендуемым документом (ПООП), в котором должны быть записаны не только рекомендуемые, но и обязательные к применению компетенции. В результате в 2001 году ПООП были отменены, а ФГОС-4 дополнен.

Компетенции же, их теперь четыре вида (универсальные, базовые, общепрофессиональные и профессиональные), записаны чрезвычайно широко. Некоторая конкретизация их записана в результатах обучения (в форме "знает", "умеет"). Но дальше каждый вуз их может трактовать, как угодно. В результате исчезает общеобразовательное пространство Российской Федерации. Перед ФГОС должна стоять задача, как при сохранении общего образовательного пространства дать свободу образовательным организациям. По-видимому, для базового высшего образования нужно закрепить в ФГОС минимум содержания образовательных программ, который должен составлять от 60 до 80 процентов общего объема, а оставшиеся 20–40 процентов отдать в распоряжение образовательной организации. Для специализированного высшего образования (магистратуры), по-видимому, можно уменьшить инвариантную часть и, соответственно, увеличить вариативную часть.

Содержание образовательных программ вытекает из компетенций и раскрывается в учебных дисциплинах. В ФГОС должны быть напрямую записаны такие дисциплины, входящие в 60–80 процентов. А на оставшиеся 20–40 процентов образовательная организация должна добавить ещё дисциплины, которые считает, нужно ввести в учебный процесс. Таким образом 60–80 процентов — это инвариантная часть, а 20–40 процентов – вариативная.

Соотношение инвариантной и вариативной части образовательной программы должно быть определено для каждого направления подготовки (специальности, укрупненной группы, области и вида профессиональной деятельности) и определить такое соотношение – задача ФУМО.

Содержание учебной дисциплины инвариантной части также может быть разделено на инвариантную и вариативную часть. В ФГОС нужно зафиксировать содержание инвариантной части и её объем, а оставшуюся часть отдать в распоряжение образовательной организации. Таким образом подготовленные ФУМО ФГОСы нужно дополнить.

¹ ФГОС профессионального образования разрабатываются по уровням образования, либо по профессиям, специальностям и направлениям подготовки по соответствующим уровням образования или укрупненным группам профессий, специальностей и направлений подготовки, а также по областям и видам профессиональной деятельности, утверждаем в соответствии с трудовым законодательством (Ст.11, п.5 Федерального закона Об образовании в Российской Федерации)

² Проекты ФГОС-4 были подготовлены с учётом положений Указа Президента

В образовательном стандарте 1993 г. [1]. Обязательный минимум содержания образовательной программы по направлению 550800 – Химическая технология и биотехнология по циклу общих гуманитарных и социально-экономических дисциплин составлял 1892 часа, по циклу математических и общих естественнонаучных дисциплин – 2088 часа, по циклу общепрофессиональных дисциплин – 1749 часов (в том числе основы биотехнологии – 136 часов) и цикл специальных дисциплин – 255 часов. Причем вуз имел право изменять объем часов в пределах 5 %.

Обязательный минимум содержания учебной дисциплины «Основы биотехнологии» включал в себя следующее: микробная, растительная и животная клетки – основной объект биотехнологии; строение и химический состав клеток, основные биополимеры клеток, органеллы клеток; поступление веществ в клетку и их метаболизм; ферментативный катализ и основы кинетики биохимических реакций; характеристики, рост и культивирование микроорганизмов; методы обнаружения и выделения микроорганизмов; основные понятия генетики; основы биосинтетических процессов; инженерные основы биотехнологии; технологические приемы и аппаратное оформление процессов выращивания микроорганизмов; технологические основы получения метаболитов; инженерная энзимология, иммобилизованные ферменты; прикладная геномная и клеточная инженерия; биотехнологические производства; типовые схемы промышленных процессов получения: биомассы белка и аминокислот, ферментов, антибиотиков и продуктов брожения; важнейшие продукты биотехнологии; основные характеристики и потребительские свойства; надежность биотехнологических систем и проблемы охраны окружающей среды.

В структуре ООП бакалавриата стандарта 2010 года [2] базовая часть гуманитарного, социального и экономического цикла составляла 20–22 зачетные единицы³, базовая часть математического и естественнонаучного цикла 70–75 зачетных единиц, базовая часть профессионального цикла 25–30 зачетных единиц.

Проектируемые результаты освоения учебных циклов для учебных дисциплин напрямую связанных с биотехнологией включали в себя: уровни организации и свойства живых систем; роль биологического многообразия как ведущего фактора устойчивости живых систем и биосферы в целом; химическую организацию, строение и функции клетки эукариотов и прокариотов; обмен веществ и превращение энергии в клетке; воспроизведение и жизненный цикл клетки; размножение и индивидуальное развитие организмов; основные группы живых организмов; закономерности наследования и изменчивости; эволюционное учение; микроэволюцию и макроэволюцию; генетические и экологические основы эволюции; понятия биосферы, микроорганизмов; метаболизм микроорганизмов; анаэробное и аэробное окисление у микроорганизмов; процессы биосинтеза и биотрансформации у микроорганизмов; генетику, химическую организацию, строение и функции клетки эукариотов и прокариотов; строение, состав и физиологическую роль клеточной стенки и цитоплазматической мембраны; внутриклеточные органеллы; основные классы биомолекул (белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы), их биологические функции в клетке; молекулярные механизмы передачи генетической информации; структуру биологических мембран; принципы биоэнергетики; пути и механизмы преобразования энергии в живых системах; аэробные и анаэробные окислительно – восстановительные процессы; фотосинтез и хемосинтез; азотфиксацию; биосинтез веществ в клетках; организацию биосинтетических процессов в клетках эукариот и прокариот; вторичные метаболиты; транспорт субстратов и продуктов; строение и состав генома прокариотических и эукариотических организмов; рекомбинацию генов; молекулярный инструментальный генной инженерии; изменчивость микроорганизмов; основы селекции микроорганизмов.

К 2026 году необходимо дополнить инвариантной частью, включающую обязательный минимум содержания образовательной программы как по объему, так и по содержанию учебных дисциплин.

Литература

1. Государственный образовательный стандарт высшего профессионального образования. Требования к обязательному минимуму содержания и уровню подготовки бакалавра по направлению 550800 Химическая технология и биотехнология (стандарт 1993 г.) Портал федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования

2. <https://fgosvo.ru/archivegosvpo/index/2?parent=75&edutype=2>

3. Федеральный государственный образовательный стандарт высшего профессионального образования по направлению подготовки 240700 биотехнология (квалификация (степень) "бакалавр"). Портал федеральных государственных образовательных стандартов высшего образования <https://fgosvo.ru/fgosvpo/index/1/23>

³ Зачетная единица составляет 36 академических часов (или 27 астрономических часов)

ПРЕИМУЩЕСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ STEM-ОБРАЗОВАНИЯ В ПОДГОТОВКЕ ИНЖЕНЕРОВ

Н.И. Репников, С.И. Нифталиев, Л.В. Лыгина

Воронежский государственный университет инженерных технологий, г. Воронеж, Россия

Причинами возникновения трудностей современного инженерного образования являются недостаточная профильная практическая подготовка выпускников университетов. Большинство реализуемых образовательных программ слишком «теоретичны» и не уделяют достаточного внимания практическим навыкам, необходимым для успешной работы инженера [1]. Многие эксперты в образовательной деятельности отмечают отсутствие актуализированных дидактических единиц в рабочих программах профессиональных дисциплин. Быстрое развитие технологий требует постоянного обновления знаний и навыков, однако многие образовательные программы не успевают за изменениями в индустрии. Инженерная работа выпускника образовательной организации включает в себя не только технические аспекты, но и коммуникацию с коллегами, работодателями, анализ требований и понимание бизнес-процессов, однако многие инженеры не обладают достаточным уровнем сформированности надпрофессиональных компетенций. Отсутствие междисциплинарности образовательных программ, внимания к этике и устойчивому развитию – также присутствует и отмечается в качестве «слабых сторон» подготовки обучающегося университета. Современные задачи требуют совместной работы специалистов разных направлений, однако многие инженеры не умеют работать в команде и осуществлять совместные проекты. Специалисты технического профиля должны учитывать последствия своей работы для окружающей среды и общества, однако не всегда уделяют достаточное внимание этим аспектам образования. Одними из основных стратегических направлений развития инженерного образования в условиях экономики нового технологического уклада выступает STEM образование (Science, Technology, Engineering, Mathematics), решающее целый ряд проблем, с которыми сталкивается современная система образования, в том числе недостаток квалифицированных специалистов и формирование кадрового резерва высококвалифицированных специалистов в области науки, технологий, инженерии и математики [2].

Разработка способов модернизации инженерного образования в Воронежском государственном университете инженерных технологий предполагает в качестве своей стратегической цели интеграцию науки, образования и производства в ходе актуализации образовательных программ с использованием принципов STEM обучения, для устойчивой технологической самостоятельности российских компаний. При исследовании возникновения проблем подготовки инженеров применялся общий документированный порядок разработки, согласования и утверждения образовательных программ, учебно-методических комплексов (УМК) по дисциплинам учебного плана с учетом интересов всех заинтересованных сторон: «СТ ВГУИТ 2.2.01–2022 Порядок разработки и утверждения образовательных программ; П ВГУИТ 2.2.02–2022 Положение о порядке формирования учебно-методического комплекса дисциплины». При создании алгоритмов составления образовательных программ прогнозируются и учитываются изменения в обществе, производится постоянное сравнение УМК с аналогичными материалами ведущих образовательных организаций в стране и за рубежом и их постоянное улучшение. В университете разработан усовершенствованный алгоритм разработки, согласования и утверждения учебного плана. В основу разработки положена желаемая квалификационная модель выпускника и общее видение на образование по данной специальности или направления подготовки высшего образования. К процессу разработки учебного плана и содержания дисциплины привлекаются преподаватели выпускающих и профильных кафедр. Учебный план имеет логически связанную структуру. При разработке национально-регионального (вузовского) компонента и состава дисциплин по выбору обучающихся учитываются мнения стратегических партнеров, обучающихся и других заинтересованных сторон с обязательным учетом принципов STEM обучения. В состав учебно-методического комплекса по реализуемым в университете образовательным программам входит логическая схема взаимосвязи учебных дисциплин, позволяющая оптимизировать построение учебных планов.

В ходе планирования, проектирования и разработки устанавливаются:

- стадии проектирования и разработки модульных учебных планов, обеспечивающих сфокусированную научную деятельность, проектное обучение и междисциплинарность;
- проведение анализа, верификации и валидации, соответствующие каждой стадии проектирования и разработки образовательных программ;
- ответственность и полномочия преподавателей ВГУИТ в области проектирования и разработки.

ВГУИТ» управляет взаимодействием различных групп, занятых проектированием и разработкой, с целью обеспечения эффективной связи и четкого распределения ответственности. Результаты планирования актуализируются, если это целесообразно по ходу проектирования и разработки образовательных программ.

В 2023–2024 учебном году в университете стартовал проект по созданию Прогрессивных инженерных школ (ПИШ) ВГУИТ по аналогии с федеральным проектом Передовых инженерных школ. Проектная инициатива заявлена в виде реализации Программы развития университета в качестве основного стратегического инструмента решения задач технологического суверенитета России. Прогрессивные инженерные школы предусматривают преобразование образовательной среды ВГУИТ, усиление ее ориентиров на практико-ориентированность, междисциплинарность, цифровую зрелость и индивидуализацию профессиональной подготовки при сохранении лучших традиций российской инженерной школы с использованием принципов STEM обучения и совершенствование условий для «бесшовной» непрерывной образовательной траектории подготовки инженера благодаря эффективной интеграции образовательных программ высшего образования.

Инициативу создания Прогрессивных инженерных школ ВГУИТ поддержали ключевые промышленные партнеры университета и прежде всего холдинг «Сибур». На базе ВГУИТ в тесном взаимодействии с промышленными партнерами университета были сформированы и с 1 сентября 2024 года начали функционировать три Прогрессивные инженерные школы ВГУИТ (далее – ПИШ ВГУИТ): ПИШ «Химические инновационные технологии / ХимИнТех ВГУИТ» в партнерстве с АО «Воронежсинтезкаучук» (ПАО «Сибур Холдинг») и ПИШ «Агропромышленные инновационные технологии / АгроИнТех ВГУИТ» в партнерстве с ГК «АГРОЭКО», ПИШ «Молочные инновационные технологии / МолИнТех ВГУИТ» в партнерстве с АО «Молвест» и группой компаний «ЭКОНИВА». Для обучающихся в ПИШ ВГУИТ промышленными партнерами были выделены в общей сложности 78 дополнительных стипендий в размере 10 000 рублей каждая. Уникальным предложением ПИШ ХимИнТех ВГУИТ» представлена готовность ПАО «Сибур Холдинг» финансировать в большем количестве, чем стипендия, стажировки студентов ВГУИТ во время обучения в ПИШ.

Стратегический проект «Прогрессивные школы ВГУИТ» существенно повысил привлекательность и востребованность университета со стороны абитуриентов и бизнес-партнеров ВГУИТ, что положительно сказалось на итогах приемной компании 2024 года. Так, общее число заявлений, поданных абитуриентами по всем уровням подготовки, превысило 14,3 тысяч (для сравнения в 2023 году их число составляло – 13,1 тысяч заявлений); число регионов Российской Федерации, представляемых абитуриентами 2024 года, возросло до 68, при этом «новыми» с географической точки зрения для университета явились 16 регионов, в том числе Камчатский край, Санкт-Петербург и Томская область. Средний балл у абитуриентов, поступивших во ВГУИТ по результатам ЕГЭ на бюджетные места, составил 65,04 балла (2023 г. – 63,1 балл, увеличен практически на 2 балла). Причем средний балл зачисленных на специальность «Фундаментальная и прикладная химия» составил более 72 баллов. После проведения конкурса среди обучающихся ПИШ, в котором участвует промышленный партнер, следует заключение трёхстороннего договора. В этом договоре указываются меры материального стимулирования от работодателя, дополнительные дисциплины и обязательства, гарантирующие успешное трудоустройство выпускников. Студенты инженерной школы примут участие в выполнении реальных проектов, которые будут предложены промышленными партнерами. Это станет частью масштабного перехода на проектное обучение, реализуемого в рамках ПИШ. Проекты будут направлены на технические решения актуальных проблем, с которыми сталкиваются предприятия-партнёры. Подготовка к их выполнению будет осуществляться в ходе научно-исследовательской работы проектного офиса ВГУИТ под руководством научного руководителя ПИШ. Результаты проектной деятельности будут представлены в курсовых работах, индивидуальных

заданиях для производственной практики студентов, выпускных квалификационных работах, включая стартапы, а также в отчетах по научно-исследовательской работе. В рамках программы исследовательской школы реализация образовательных программ осуществляется в соответствии с учебными планами с использованием принципов STEM обучения, которые учитывают специфику деятельности наших промышленных партнёров.

Создаваемые ПИШ направлены на развитие существующих в университете научно-технологических заделов по приоритетным направлениям исследований. На их основе будут формироваться специализированные центры передовых исследований, которые станут стратегическим ресурсом для соответствующих отраслей промышленности России. ВГУИТ в настоящее время значительно усилил свои компетенции и конкурентные преимущества для обеспечения технологического суверенитета экономики страны и региона по направлениям: биотехнологии, химия, переработка сельскохозяйственного сырья и продукции, сфокусировавшись на прикладных аспектах своей научно-исследовательской деятельности и ее трансформации под запросы профильных отраслей экономики (пищевой и перерабатывающей, химической и биотехнологической).

В этой связи начата работа по формированию профильных центров передовых исследований с соответствующей административной и ресурсной поддержкой на базе Лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий (молодежная лаборатория) и Научно-практической лаборатории разработки технологий напитков (совместно с компанией «Таркос»). При поддержке АО «Воронежсинтезкаучук» (ПАО «СИБУР Холдинг») в настоящее время прорабатывается заявочная документация для участия в конкурсе грантов Правительства Воронежской области на создание научно-исследовательского центра «Перспективные полимерные материалы и композиты» ВГУИТ. Общий объем научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ (без учета собственных средств и научно-технических услуг) составил по итогам первого года реализации Программы развития ВГУИТ 128,2 млн руб. (план – 125 мл руб.), в том числе за счет средств на выполнение хозяйственных договоров по заказам хозяйствующих субъектов – 68,9 млн руб. (план – 35 млн руб., рост – практически в 2 раза).

Существенный импульс в рамках реализации Программы развития ВГУИТ в 2023 году получило развитие студенческого технологического предпринимательства. Так, на конкурс «Студенческий стартап» Фонда содействия инновациям с объемом финансирования 1 млн. рублей на 1 год от обучающихся ВГУИТ было подано 14 заявок, из которых пять были поддержаны. Начата работа по запуску внутриуниверситетского конкурса «У.М.Н.И.К. ВГУИТ» по аналогии с конкурсом УМНИК Фонда содействия инновациям.

Успешная деятельность кураторов студенческих групп ВГУИТ в направлении сформированности надпрофессиональных компетенций студентов засвидетельствована тем фактом, что университет представлен одним из основных звеньев экосистемы молодежной политики Воронежской области, являясь соорганизатором 7 крупных региональных и федеральных проектов, инициатором и администратором координационной площадки руководителей психологических служб вузов региона. По линии различных грантовых конкурсов, ориентированных на поддержку молодежных проектов и инициатив, удалось привлечь более 11 млн рублей, среди них грант в форме субсидии размером в 1 млн рублей, полученный Студенческим научным обществом ВГУИТ в рамках конкурса Минобрнауки России «Студенческие научные объединения» на реализацию мероприятий по популяризации науки и научных исследований. Положительная динамика развития ВГУИТ позволила университету переместиться в Национальном рейтинге университетов Международной информационной группы «Интерфакс» сразу на 13 позиций вверх – с 187–189 места в 2023 году на 176-е – в 2024 году.

Формирование консорциумов и других сетевых объединений в рамках ПИШ становится эффективным инструментом для развития уникальных профессиональных навыков у выпускников нашего университета. Это, в свою очередь, способствует повышению качества подготовки высококвалифицированных инженерных кадров для нашей страны. Успешная деятельность университета на базе Технологической платформы «Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания» доказывает это. Результаты подтверждаются тем, что платформа вошла в тройку лучших во всероссийском рейтинге, составленном по итогам мониторинга Межведомственной рабочей группы по технологическому развитию, действующей при Правительственной комиссии по модернизации экономики и инновационному развитию России. Эта технологическая платформа служит эффективным инструментом коммуникации для сотрудников

ВГУИТ. Она способствует активизации усилий по созданию технологической базы, которая включает в себя набор прорывных сквозных аграрно-пищевых технологий. Применяемые технологии направлены на решение проблем продовольственной безопасности, здорового питания населения и рационального природопользования. Наряду с модернизацией инженерного образования, важнейшим приоритетом развития ВГУИТ на пути к укреплению позиций в обеспечении технологического суверенитета России является рыночная направленность научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, что обеспечит сосредоточение усилий университетского научного сообщества на коммерциализации результатов прикладной науки.

Таким образом, создаваемые ПИШ ВГУИТ ориентированы на наращивание существующих в университете научно-технологических заделов по приоритетным направлениям исследовательской деятельности университета и формирование на их базе профильных центров передовых исследований, представляющих собой стратегический ресурс для соответствующих отраслей промышленности России. Применение STEM образования в ходе реализации проекта ПИШ обеспечивает выход ВГУИТ совместно с промышленными партнерами на конкретные продуктивные результаты в интересах обеспечения технологического суверенитета и продуктовой безопасности страны и региона.

Литература

1. Яковенко Т.В., Бойко Н.З., Бойко Е.А. Инновационная стратегия развития инженерного образования // Актуальные вопросы современной науки и образования. Сборник материалов международной научно-практической конференции. Под общей редакцией М.А. Сурхаева. Махачкала, 2022. С. 337–341.
2. Что такое STEM образование, и почему компании ценят таких специалистов URL.: <https://trends.rbc.ru/trends/education/5f6399a69a79471ec02bfe4f> (дата обращения 20.06.2024).



Уважаемые коллеги!
Дорогие друзья!

Мы выражаем большую и искреннюю благодарность всем участникам XII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» за ваш труд в определении основных проблем в области биотехнологии и выявлении тенденций развития в данной области, за обмен достижениями биотехнологии и обсуждение путей оптимизации образовательного процесса студентов-биотехнологов. Желаем вам творческих успехов, больших научных достижений и побед!

До новых встреч!
С уважением, оргкомитет.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ
журнала «Актуальная биотехнология»

Приглашает к публикации студентов, аспирантов и научных работников по следующим тематикам:

1. ЕСТЕСТВЕННЫЕ НАУКИ

1.5. Биологические науки

1.5.4. Биохимия

1.5.6. Биотехнология

1.5.7. Генетика

1.5.11. Микробиология

1.5.15. Экология

2. ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

2.7. Биотехнологии

2.7.1. Биотехнология пищевых продуктов, лекарственных и биологически активных веществ

4. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

4.3. Агроинженерия и пищевые технологии

4.3.3. Пищевые системы

Требования к оформлению статей

1. Материалы представляются в двух видах: на электронном носителе и распечатанные на одной стороне листа белой бумаги формата А4 (1 экз.) на лазерном принтере. Они должны быть набраны в редакторе MSWord версия не ниже 6.0 (Office не выше 2007) и напечатаны через одинарный интервал в две колонки шрифтом:

- основной текст – TimesNewRomanCyr 11 с полями: левое 22 мм, правое 18 мм, верхнее и нижнее 25 мм;
- колонтитулы от края – верхний и нижний 18 мм;
- заголовки по центру – TimesNewRomanCyr 11, жирный;
- красная строка -1 см;
- перенос слов – автоматический.

Со смещением на 5 см от рамки текста в начале статьи набираются:

- УДК– Times New Roman Cyr 12;
- должность, степень И. О. Ф. авторов – TimesNewRomanCyr 12;
- название статьи – TimesNewRomanCyr 16, жирный, строчной (без переноса);
- аннотации– Times New Roman Cyr 9;
- ключевые слова – TimesNewRomanCyr 9, до 10 слов;

2. Объем для статьи – 3-8 с. Структурно статья должна иметь четко выраженное *введение*, в котором ставится задача (описывается решаемая проблема), *основную часть*, где излагаются используемые авторами пути решения поставленной задачи, приводятся и обсуждаются результаты, и *заключение*, в сжатой форме подводящее итог работы. Повторение одних и тех же данных в статье, таблице и графике не допускается. Размерность всех характеристик приводится в системе СИ.

3. К каждой статье под заглавием дается аннотация (объем до 600 печатных знаков) на русском и английском языках через 1 строку друг от друга. Название статьи, фамилия и инициалы приводятся отдельно на английском языке.

4. Название статьи или краткого сообщения должно быть лаконичным и точно отражать содержание.

5. Иллюстрации в формате jpeg или gif:

должны быть расположены после ссылки на них в тексте;

должны выполняться на компьютере с обозначением всех необходимых букв и символов в соответствии с ЕСКД и Р 50-77-80. Все буквенные и цифровые обозначения, приведенные на рисунках, поясняются в основном или подрисуночном тексте. Подрисуночные подписи даются TimesNewCyr 10, на формат рисунка.

Графические объекты (диаграммы, графики) должны быть активными (т.е. подлежать редактированию стандартными средствами, например, MSExcel).

6. Формулы и буквенные обозначения:

- × буквы латинского алфавита, используемые в индексах, набирают курсивом;
 - × буквы русского и греческого алфавита – прямым шрифтом; знак вектора – полужирным;
 - × нумерация формул в тексте сквозная. Нумеруются только те формулы, на которые есть ссылки в тексте.
- Формат формул (стандартный редактор) :
- × стиль – «математический»;
 - × размер символа — 11

Sizes (Размеры)	
Full (Обычный)	11 – 10
Subscript/Superscript (Крупный индекс)	7
Sub-subscript/Superscript (Мелкий индекс)	5
Symbol (Крупный символ)	12
Subsymbol (Мелкий символ)	9

7. Таблицы (слово печатается вразрядку) должны быть с заголовками и обязательно располагаться после ссылки на них в тексте. Графы в таблицах должны иметь краткие заголовки. Упоминаемые в заголовках величины сопровождаются соответствующими единицами измерений.

8. Литература (слово печатается: TimesNewRomanCyr 11, жирный, прописной) включает источники, использованные автором при написании статьи, и должна содержать не более 10 наименований. Ссылки в тексте даются в квадратных скобках: [1], помещаются в конце статьи и оформляются согласно ГОСТ 7.1-2003.

В журнале публикуются оригинальные научные статьи теоретического и экспериментального характера. Автор указывает рубрику (в сопроводительном письме), в которой он хотел бы разместить свою статью:

Статья должна быть тщательно проверена и подписана всеми авторами.

На отдельном листе авторы указывают название статьи на русском и английском языке, ФИО полностью, адрес, ученую степень, должность, место работы, контактный телефон, e-mail, а также отмечают автора для переписки.

К статье должны прилагаться сопроводительные документы:

- сопроводительное письмо;
- выписка из протокола заседания кафедры (лаборатории) с рекомендацией статьи к печати;
- положительная рецензия ведущего ученого в данной области или члена редакционной коллегии, заверенная подписью и печатью.

•

